

REKONSTITUTION DES MITOCHONDRIALEN ADENINNUCLEOTIDCARRIERS IN KÜNST- LICHEN PHOSPHOLIPIDMEMBRANEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von
REINHARD KRÄMER
aus
Ludwigsburg

München

1977

1978

REKONSTITUTION DES MITOCHONDRIALEN ADENINNUCLEOTIDCARRIERS IN KÜNST- LICHEN PHOSPHOLIPIDMEMBRANEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians Universität München



vorgelegt von

REINHARD KRÄMER

aus

Ludwigsburg

München

1977



1. Berichterstatter : Prof. Dr. M. Klingenberg
2. Berichterstatter : Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung : 10. Februar 1978

Meinem Großvater
und ersten Lehrer
in den Naturwissenschaften

FRANZ DANIEL

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1974 bis September 1977 am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians Universität München durchgeführt.

Die Arbeit entstand auf Vorschlag und unter Anleitung von Prof. Dr. M. Klingenberg. Ihm danke ich für die Themenstellung und für kritische Diskussionen und Anregungen, die zur Überwindung der auftretenden Probleme sehr hilfreich waren.

Weiterhin danke ich Frau S. Tsompanidou und Frau G. Sipp für die tatkräftige Hilfe bei der experimentellen Arbeit. Allen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die mich bis März 1977 durch ein Promotionsstipendium unterstützt hat, bin ich ebenfalls zu Dank verpflichtet. Schließlich danke ich noch Herrn Dr. Fietzek für die Ausführung der Aminosäureanalysen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeine Bemerkungen zur Rekonstitution	1
1.2. Charakterisierung des Adeninnucleotid-Carriers in Mitochondrien	3
1.3. Zielsetzung der Arbeit	5

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material	7
2.2. Analytische Methoden	7
2.3. Isolierung des Carrierproteins	9
2.4. Liposomenpräparation	9
2.5. Messung und Rekonstitution der Inhibitorbindung	11
2.6. Messung und Rekonstitution des Adeninnucleotid-Austausches	12

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchungen zur Wechselwirkung des Adeninnucleotid-Carriers mit Phospholipiden	15
3.1.1. Bestimmung der nach der Isolierung am Carrier haftenden Phospholipide	15
3.1.2. Einfluß von Phospholipasen auf die Funktion des Adeninnucleotid-Carriers	18
3.1.3. Wirkung von Detergentien auf den Transport von Adeninnucleotiden in Mitochondrien	26
3.2. Isolierung und Charakterisierung des Adeninnucleotid-Carriers	31
3.2.1. Isolierung des unbeladenen Carrierproteins	31
3.2.2. Stabilität des isolierten Carrierproteins	35
3.2.3. Weitere Charakterisierung des Carrierproteins	37
3.3. Rekonstitution der Bindungseigenschaften des Adeninnucleotid-Carriers	40
3.3.1. Inkorporation des Carrierproteins in die Liposomenmembran	40
3.3.2. Rekonstitution der CAT-Bindung	44

3.3.3. Rekonstitution der BKA-Bindung	46
3.3.4. Spezifische Wechselwirkung verschiedener Liganden mit dem rekonstituierten Carrier	50
3.4. Rekonstitution der Transportaktivität des Adeninnucleotid-Carriers in künstlichen Phospholipidmembranen	57
3.4.1. Mobilität des Carriers nach der Inkorporation in Phospholipidmembranen	57
3.4.2. Aktivität des Carriers nach dem Einbau in die Phospholipidmembranen	61
3.4.2.1. Aktivität des Carriers in Liposomen	61
3.4.2.2. Aktivität des Carriers in großen Vesikeln	62
3.4.3. Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports im künstlichen Vesikelsystem	64
3.4.3.1. Rekonstitution der Transportaktivität	64
3.4.3.2. Charakterisierung des rekonstituierten Adeninnucleotid-Transports	67
 4. DISKUSSION	
4.1. Wechselwirkung des Carriers mit den Phospholipiden der Mitochondrienmembran	79
4.2. Isolierung und Charakterisierung des Adeninnucleotid-Carriers	81
4.3. Rekonstitution von Inhibitorbindung und Transport von Adeninnucleotiden im künstlichen System	82
4.3.1. Rekonstitutionsverfahren	82
4.3.2. Rekonstitution der Inhibitorbindung	85
4.3.3. Rekonstitution des Adeninnucleotid- Transports	87
 5. ZUSAMMENFASSUNG	92
 6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	95
 7. LITERATUR	96

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeine Bemerkungen zur Rekonstitution

Die Methode der Rekonstitution und ihre Anwendung auf die unterschiedlichsten - geeigneten und ungeeigneten - Objekte erscheint in der gegenwärtigen biochemischen Fachliteratur geradezu als Modetrend. Es wirkt heute fast unvollständig, wenn einer Arbeit, in der ein System mit biochemischen Methoden analysiert und charakterisiert wurde, nicht unmittelbar darauf die Rekonstitution des Systems in irgendeiner Weise folgt. Dabei muß betont werden, daß eine Rekonstitution nur dann sinnvoll und angebracht ist, wenn sie über die einfache Wiederherstellung der Funktion hinaus Aussagen ermöglicht, die im ursprünglichen System nicht oder nur sehr viel schwieriger zu erhalten sind. Bei vielen publizierten Rekonstitutionsversuchen ist zu kritisieren, daß keine Angaben über die wiederhergestellte Aktivität im Vergleich zum ursprünglichen System gemacht werden. Bei genauem Nachrechnen ergeben sich dann oft nur Rekonstitutionseffekte von 1 % und darunter, die an einer sinnvollen Aussage im künstlichen System zweifeln lassen.

Was versteht man nun unter einer Rekonstitution?

Grundsätzlich gehen einer Rekonstitution voraus:

- 1) die Charakterisierung des Systems in seiner ursprünglichen Umgebung,
- 2) die Spaltung der natürlichen Einheit und die Isolierung des Systems in seinen einzelnen Bestandteilen, und
- 3) die Charakterisierung der isolierten Bestandteile (meist Proteine und Phospholipide).

Der diesen analytischen Stufen folgende Schritt der Synthese von isolierten Einzelteilen des Ausgangssystems ist dann die Rekonstitution.

Diese Methode hat an Bedeutung gewonnen, weil die nachfolgend erläuterten Aussagen über das zu untersuchende System oft nur durch eine Rekonstitution zu gewinnen sind:

- 1) Eine geglückte Rekonstitution beweist, daß durch die verwendete Isolierungs- und Reinigungsmethode tatsächlich das richtige Protein gewonnen wurde, daß in Bezug auf die rekonstituierte Funktion das vollständige System isoliert wurde und daß das isolierte System nativ und funktionell aktiv ist.
- 2) Eine geglückte Rekonstitution ermöglicht meist Untersuchungen in einer - verglichen mit dem Ausgangssystem - bedeutend einfacheren Anordnung. Aus der Vielzahl von Proteinen und Phospholipiden wird jeweils eine Komponente herausgezogen und für sich untersucht. Damit ist jedoch auch klar, daß eine Rekonstitution nur dann die gewünschten Aussagen zuläßt, wenn gereinigte und eindeutig definierte Ausgangsprodukte verwendet werden. Diese Forderung ist leider bei vielen publizierten Arbeiten dieser Art nicht erfüllt.

Für die Wiederherstellung einer Transportfunktion im speziellen Fall ergeben sich über die geschilderten Voraussetzungen hinaus noch Forderungen an das künstliche Membransystem. Da ein vektorieller Vorgang beobachtet werden soll, müssen zwei definierte Kompartimente vorhanden sein, die eine Messung des Transports ermöglichen.

Auf die Fülle der Literatur über Rekonstitutionen soll hier nur kurz eingegangen werden. Neben Rekonstitutionsversuchen an enzymatischen Systemen wie β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (1,2), verschiedenen ATPasen (3 - 6), Cytochromoxidase (7 - 9), NADH-Dehydrogenase (10), mitochondriale Transhydrogenase (11), mikrosomale Hydroxilierung (12 - 14), Bakteriorhodopsin (15 - 17), Adenylcyclase (18) u.v.a., sind für diese Arbeit be-

sonders Untersuchungen mit Transportsystemen wichtig. Dabei ist zuerst die umfangreiche Literatur über den Transport von Kationen über die Na,K-ATPase (19,20) und die Ca-ATPase (21) zu nennen. Auch mit der Oligomycin-sensitiven ATPase (22) und dem mitochondrialen Phosphat-Transport (23) sind Rekonstitutionsversuche beschrieben worden. Den Arbeiten zur Rekonstitution des Zuckertransports durch Sucrase (24) und des mitochondrialen Glutamat-Transports (25) ist wohl keine Bedeutung mehr zuzumessen. Die Arbeiten von Shertzer und Racker (26 - 28) zur Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports werden in Abschnitt 1.3. und Abschnitt 4.3.3. ausführlich diskutiert. In neuerer Zeit sind von den Arbeitsgruppen um R. Crane (29,30) und P. Hinkle (31) Arbeiten zur Rekonstitution des Zuckertransports in biologischen Membranen erschienen. Beide Gruppen verwenden jedoch ungereinigte Solubilisate zur Rekonstitution.

1.2. Charakterisierung des Adeninnucleotid-Carriers in Mitochondrien

Zur ausführlichen Charakterisierung der Eigenschaften und der Funktion des ADP,ATP-Carriers in der inneren Mitochondrienmembran sei auf (32 - 37) verwiesen. In dieser Arbeit kann nur eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse gegeben werden :

Die Innenmembran von Mitochondrien trägt zahlreiche Enzyme, die an Oxidations- und Phosphorylierungsreaktionen beteiligt sind. Während der letzten 10 Jahre wurden darüber hinaus in dieser Membran eine Reihe von spezifischen Transportsystemen für zahlreiche Metabolite, die als Intermediate im Stoffwechsel dienen, entdeckt.

Das am besten untersuchte Transportsystem ist der Austausch zwischen extra- und intramitochondrialem ADP und

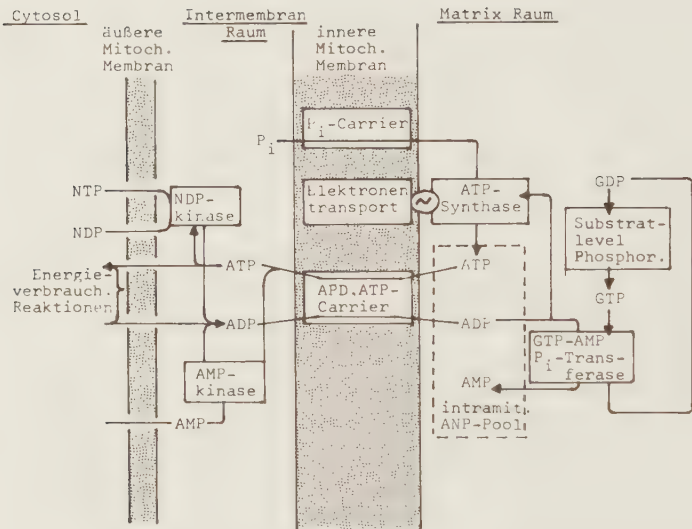


Abb.1 Die Rolle des ADP, ATP-Carriers in mitochondrialen Phosphat-Übertragungsreaktionen

ATP, eine Reaktion, die für den Energietransfer von der oxidativen Phosphorylierung zu extramitochondrialen Prozessen notwendig ist. Die Permeabilitätseigenschaften, die Kompartimentierung des intra- und extramitochondrialen Adeninnucleotid-Systems und seine Beziehung zum Phosphattransfer in Mitochondrien sind in Abb.1 dargestellt. Der Transport von ADP und ATP zusammen mit Phosphat durch die Innenmembran der Mitochondrien ist das aktivste Transportsystem in aeroben eukaryotischen Zellen. Das ADP, ATP-System ist die einzige Verbindung zwischen den inner- und außermitochondrialen Reaktionen der Phosphat-Übertragung.

Eine große Zahl von Versuchen an Mitochondrien und an submitochondrialen Partikeln, meist unter Zuhilfenahme

der spezifischen Inhibitoren CAT (38,39) und BKA (40) führten zu folgendem Carrierkonzept (34,41,42) :

Die Bindungsstelle des Carrierproteins für Nucleotide und für Inhibitoren kann sich entweder auf der Außen- oder auf der Innenseite der Membran befinden. Ist die Bindungsstelle nach außen gerichtet, so befindet sie sich in einer Konformation (c-Konformation), in der sie Nucleotide oder den Inhibitor CAT binden kann, ist sie jedoch nach innen gerichtet, so ist die Bindung neben Nucleotiden spezifisch für den Inhibitor BKA (m-Konformation). Dieser Wechsel der Spezifität ist neben dem Wechsel der Richtung von außen nach innen mit einem Wechsel der Konformation des Proteins verbunden. Das Carrierprotein ist nur bei Anwesenheit von ADP oder ATP in der Membran "beweglich", d.h. fähig zum Konformationswechsel, nicht jedoch im ligandenfreien Zustand oder bei Anwesenheit von CAT oder BKA. Dieses Modell erklärt auch die für Abschnitt 3.3.3. wichtige Beobachtung, daß bei Vorliegen der c-Konformation die BKA-Bindung an den Carrier erst nach Zugabe von ADP stattfinden kann, das einen Wechsel in die m-Konformation ermöglicht.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Die Isolierung des CAT-Protein Komplexes aus Rinderherz-mitochondrien (43,44) machte direkte proteinchemische Untersuchungen an dem isolierten Protein möglich, das vermutlich der Adennucleotid-Carrier ist. Es konnte jedoch zu diesem Zeitpunkt und auf Grund dieser Versuche noch nicht entschieden werden, ob das isolierte Protein das vollständige Carriersystem darstellt und ob das isolierte und gereinigte Protein noch in aktivem Zustand vorliegt. Diese Fragen sind nur mit den Methoden der funktionellen Rekonstitution des Carrierproteins im künstlichen Phospholipid-Membransystem zu beantworten.

Während der Arbeit an diesem Projekt wurden von Shertzer und Racker Versuche zur Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports veröffentlicht (26 - 28). Da diese Experimente jedoch mit undefinierten Ausgangsprodukten (vgl. Abschnitt 4.3.3.) durchgeführt wurden, sind damit keine eindeutigen Korrelationen zwischen dem rekonstituierten Carrierprotein und der wiederhergestellten Funktion möglich. Ein solches System erfüllt nicht die in Abschnitt 1.1. beschriebenen Forderungen an eine sinnvolle Rekonstitution.

Über die oben angesprochenen Ziele der eindeutigen Identifizierung und des Nachweises der nativen Funktion hinaus können mit einem rekonstituierten Adeninnucleotid-Transportsystem Fragen der Ionen- und Phospholipidabhängigkeit beantwortet werden, die in intakten Mitochondrien nur schwer zu klären sind. Als Fernziel dieser Arbeiten wären dann Untersuchungen zur Abhängigkeit des Adeninnucleotid-Transports von Ionengradienten und vom Membranpotential zu nennen. Eventuell ist es im rekonstituierten System auch möglich, ein Zusammenwirken mit anderen Membranproteinen klarer zu erkennen als im komplexen System der Mitochondrien.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Triton X-100 wurde von der Fa. SIGMA bezogen, LAPAO war ein Geschenk der Fa. Goldschmidt, Essen (Aminoxid WS-35). Eigelb-Lecithin stammte von der Fa. E.Merck, Darmstadt, Cardiolipin von der Fa. Koch-Light und Phosphatidsäure von der Fa. SIGMA. Reines Lecithin wurde nach der Methode von Beyer et al. (45) hergestellt, mitochondriale Phospholipide wurden nach Rouser et al. (46) extrahiert und rohe Sojabohnen-Phospholipide (Fa. Associates Concentrates, Woodside, N.Y.) nach Kagawa et al. (47) gereinigt. Phospholipase stammte von der Fa. Boehringer, Mannheim, alle verwendeten radioaktiven Nucleotide von der Fa. NEN Chemicals, DOWEX 1x8 von der Fa. SERVA. Radioaktives CAT und BKA wurde nach Riccio et al. (39) und Babel et al. (48) präpariert. Hydroxylapatit wurde nach Tiselius, wie von Bernardi (49) beschrieben, selbst hergestellt.

2.2. Analytische Methoden

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach Lowry et al. (50) oder Bode et al. (51). Phosphat wurde nach der Methode von Chen et al. (52) oder, wenn die Bestimmung auf Dünnschichtplatten notwendig war, nach Keenan et al. (53) gemessen. LAPAO wurde mit Hilfe einer Redoxtitration bestimmt (54), die freundlicherweise von der Fa. Goldschmidt in ausgearbeiteter Form mitgeteilt wurde; Triton X-100 wurde nach Garewal (55) analysiert. Der Oxidationsgrad der verwendeten Phospholipide wurde nach Bernheim et al. (56) gemessen. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach Neville und Glossmann (57). Es wurden 5x100 mm Gele mit 11 % Acrylamid und 0,1 % Quervernetzer verwendet. Die Gele wurden mit Co-

massie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Die Dünnschichtchromatographie von Phospholipiden erfolgte auf Kieselgelplatten mit 0.25 mm Schichtdicke (E.Merck, Darmstadt). Für die eindimensionale Chromatographie wurde als Fließmittel Chloroform/Methanol/Aceton/Eisessig/Wasser = 30/10/40/10/5 verwendet. Bei der zweidimensionalen Chromatographie ging dieser Auftrennung in saurem Milieu ein Lauf in einem ammoniakalischen Fließmittel (Chloroform/Methanol/25% Ammoniak = 65/35/5) voraus. Die Auftrennung von extrahierten mitochondrialen Phospholipiden in diesem zweidimensionalen System zeigt die Abb.2.

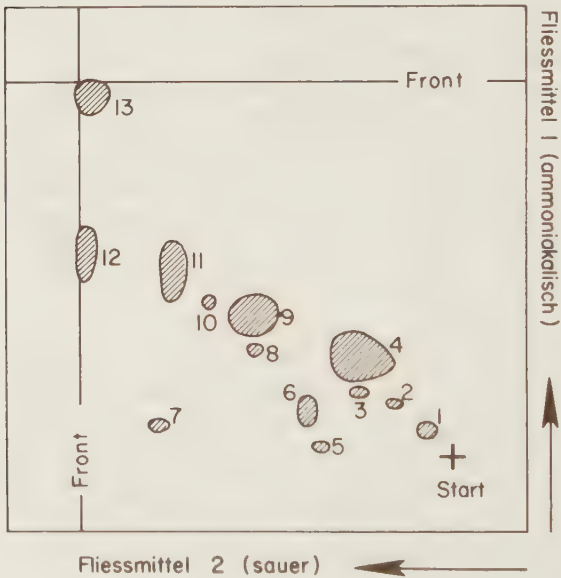


Abb.2 Dünnschichtchromatographie von mitochondrialen Phospholipiden (1, Lyso-PC; 2, Sphingomyelin; 3, Lyso-PE; 4, PC; 5, PS; 6, PI; 7, PG; 8, Lyso-DPG; 9, PE; 10, PA; 11, DPG; 12, freie Fettsäuren; 13, Neutralfette).

2.3. Isolierung des Carrierproteins

Mitochondrien aus Rinderherzen wurden nach Löw und Vallin (58) präpariert und unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Isolierung des Carrierproteins erfolgte in Anlehnung an die von Riccio et al. (43,44) mit Triton X-100 entwickelte Methode zur Isolierung des CAT-Protein Komplexes. Die Säulenchromatographie wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, der Solubilisierungspuffer durch 1 % LAPAO, 0,1 M Na_2SO_4 , 10 mM Tricine-KOH, 1 mM EDTA, pH 7,5 ersetzt. Als Äquilibrierungspuffer wurde 0,1 % LAPAO, 50 mM NaCl, 10 mM Tricine-KOH, 1 mM EDTA, pH 7,5 verwendet. Zur weiteren Beschleunigung der Isolierung wurde ein "batch-Verfahren" entwickelt : Die in gleicher Weise solubilisierten Mitochondrien wurden direkt mit Hydroxylapatit, das vorher mit 0,1 % LAPAO, 0,1 mM Na_2SO_4 , 10 mM Tricine-KOH, 1 mM EDTA, pH 7,5 äquilibriert worden war, im Verhältnis 10 mg Protein/ 1 ml Hydroxylapatit-Sediment gemischt. Nach 10 min Inkubationszeit wurde abzentrifugiert (10 min bei 20 000 g), der Überstand enthält das solubilisierte ADP,ATP-Carrier Protein.

2.4. Liposomenpräparation

Liposomen für die Rekonstitution der Bindung und des Transports wurden auf verschiedene Weise hergestellt. Für die Bindungsversuche wurden Phospholipide in einem Branson Sonifier mit Titan-Mikrospitze in Pufferlösung (50 mM NaCl, 5 mM Tricine-KOH, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) in einer Konzentration von ca 50 mg/ml unter Eiskühlung und Stickstoffatmosphäre beschallt (je 30 sec Beschallung, 30 sec Pause). Nach einer Beschallungszeit von 90 min wurden die Vesikel zur Abtrennung des vom Schallrüssel freigesetzten Titan für 30 min bei 90 000 g zentrifugiert. Die relativ

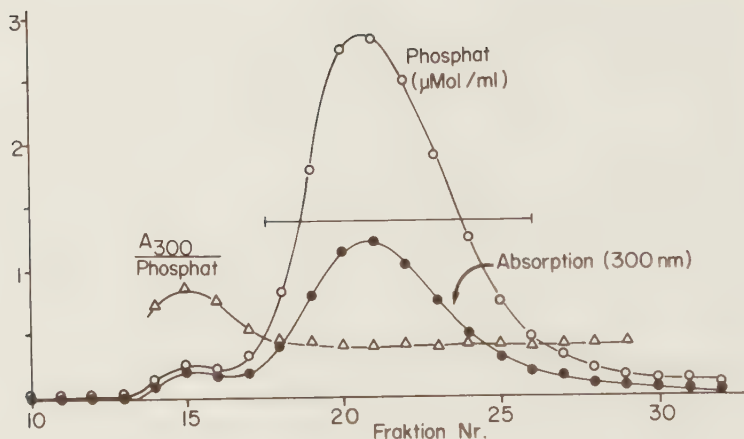


Abb.3 Chromatographie von Liposomen auf Sepharose 4B
Der mit ————— bezeichnete Bereich mit konstantem $A_{300}/\text{Phosphat}$ -Verhältnis kennzeichnet eine relativ homogene Liposomenpopulation (ca 85 % der gesamten Liposomen).

gute Homogenität der so erhaltenen Liposomen (59,60) zeigt die Chromatographie auf Sepharose 4B (Abb.3). Das interne Volumen, das durch ^{14}C -Sucrose bestimmt wurde, belief sich auf etwa $0,35 \mu\text{l}/\mu\text{Mol}$ Phospholipid. Für die Transportversuche wurden die Liposomen nach kürzerer Beschallungszeit von 10 - 20 min in 150 mM Mannit, 10 mM Tricine-KOH, 0,1 mM EDTA, 20 mM eines Nucleotids, pH 7,5 direkt zum Proteineinbau verwendet.

Für einige Versuche wurden auch Liposomen nach der Ätherverdampfungsmethode hergestellt. In einer Apparatur, ähnlich der von Deamer und Bangham (61) beschriebenen, wurde eine ätherische Lösung von Phospholipiden in eine 63°C heiße Pufferlösung eingespritzt. Beim sofortigen Verdampfen bilden sich Vesikel, die jedoch viel größer

(Durchmesser ca 1000 - 1500 Å) sind als die durch Beschallung hergestellten (Durchmesser ca 200 - 300 Å). Die Innenvolumina der so präparierten Vesikel in Abhängigkeit von der Phospholipidzusammensetzung zeigt Abb.4. Mit reinem Lecithin kann man mit dieser Methode keine Vesikel erhalten, in den Versuchen mit diesen Liposomen wurden daher Lecithin/Cardiolipin-Mischungen in dem Verhältnis 20/1 verwendet.

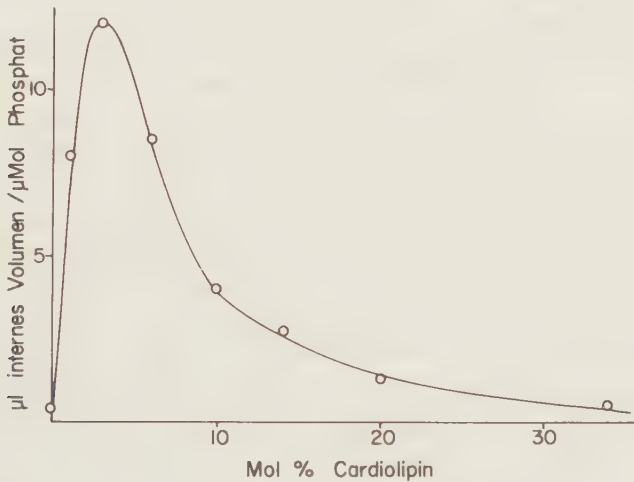


Abb.4 Innenvolumen von großen Phospholipidvesikeln

2.5. Messung und Rekonstitution der Inhibitorbindung

Zur Rekonstitution der Inhibitorbindung wurden die Liposomen (Präparation s.o.) lediglich mit dem isolierten Carrierprotein gemischt. Nach 5 - 10 min Inkubationszeit war der Ansatz dann bereit zur Bindungsmessung.

Die Bindung von Liganden an das isolierte und membran-

gebundene Carrierprotein wurde mit drei verschiedenen Methoden bestimmt :

- 1) *Gleichgewichtsdialyse* wurde in einem "Dianorm" Gerät (Dr. Weder, ETH Zürich) durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Liganden werden bei den betreffenden Experimenten angegeben. Diese Methode konnte nur bei Langzeitexperimenten angewendet werden, z.B. in manchen Verdrängungsstudien, da das anwesende Detergens LAPAO die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts auf ca 6 h bei Zimmertemperatur verlängert.
- 2) Zur *Membranfiltration* wurden die Proben durch zwei Membranfilter (Sartorius GmbH, Göttingen) gesaugt, ein Filter mit 0,2 µm Porenweite obenauf und ein anderes mit 0,01 µm darunter. Mit dieser Kombination konnten sowohl Liposomen als auch das solubilisierte Carrierprotein zurückgehalten werden; das Protein wahrscheinlich bevorzugt durch Adsorption an das Filtermaterial. Durch unspezifische Adsorption von BKA an die Filter traten mit dieser Methode Schwierigkeiten auf; für Experimente zur BKA-Bindung ist daher die folgende Methode vorzuziehen.
- 3) Auf Grund der außerordentlich festen Bindung der Liganden CAT und BKA an das Carrierprotein konnte zur Bestimmung *Gelfiltration* auf Sephadex G 75 verwendet werden. Eine klare Trennung des gebundenen vom freien Liganden (Abb.5) wurde im Fall von BKA nur bei pH Werten über 7,3 erreicht, da BKA dann vollständig dissoziiert und weniger lipophil ist. Andernfalls erscheint BKA teilweise im Ausschlußvolumen mit den Liposomen, bzw. den Detergensmicellen.

2.6. Messung und Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports

Der Transport von Adeninnucleotiden an Mitochondrien aus Rinderherzen wurde entsprechend der Methode von Weidemann et al. (62), der Transport an submitochondrialen Partikeln (SMP) nach Klingenberg (42, dort auch Präparation

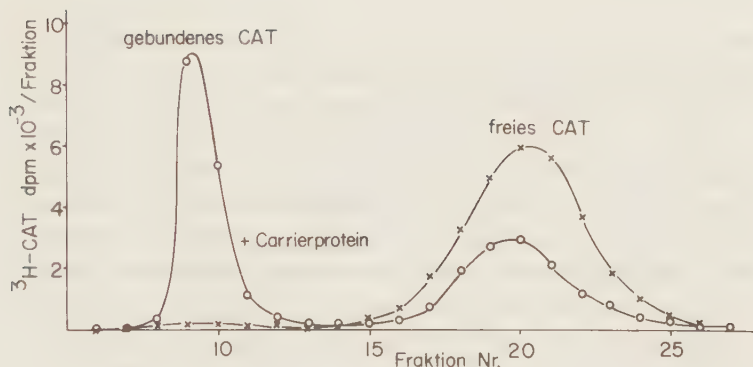


Abb. 5 Bindung von CAT an das isolierte Carrierprotein
 ^3H -CAT wurde zu Liposomen (— x —) oder zu Liposomen mit eingebautem Carrierprotein (— o —) gegeben. Trennung von freiem (Peak 2) und gebundenem (Peak 1) CAT auf einer Sephadex G 75 Säule (7 x 300 mm).

der SMP) gemessen. Die gleichzeitige Bestimmung der unspezifisch gebundenen und der transportierten Nucleotide erfolgte exakt wie in (62) beschrieben durch drei Serien von Ansätzen mit Inhibitorzusatz vor bzw. nach Reaktionsbeginn und mit einem Ansatz ohne Inhibitor.

Zur Rekonstitution der Transportfunktion war im Vergleich zur Bindungsrekonstitution ein weiterer Beschallungsschritt notwendig. Die Liposomen (Präparation s.o.) wurden in gleicher Weise mit dem Carrierprotein gemischt. Nach 5 min Inkubationszeit wurden die Vesikel ca 3 - 5 min (reine Beschallungszeit) unter reduzierter Schallenergie weiterbeschallt. Die so erhaltenen Liposomen wurden zur Abtrennung der externen Nucleotide auf eine DOWEX-1x8-Formiat Säule (63) aufgetragen. Die durchgelaufenen Vesikel wurden dann mit den angegebenen Ionen (meist 1 mM MgCl_2) und radioaktiven Nucleotiden (meist 250 μM ^{14}C -ADP bzw. ^{14}C -ATP)

inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde der Transport durch Zugabe von 10 μ M CAT gestoppt. Durch Zugabe des Inhibitors vor dem radioaktiven Nucleotid erhielt man die entsprechenden Nullwerte. Die externen Nucleotide wurden nun erneut durch DOWEX-Formiat Säulen (20 x 5 mm) entfernt und das Eluat der Säulen in einem Flüssig-Szintillationszähler gezählt (Elutionspuffer: 150 mM Mannit). Die gemessene Radioaktivität erlaubt zusammen mit der bekannten spezifischen Aktivität der zugegebenen Nucleotide eine Berechnung der Mengen der ausgetauschten Nucleotide.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchungen zur Wechselwirkung des Adeninnucleotid-Carriers mit Phospholipiden

Im Abschnitt 3.1. sind einige Voruntersuchungen beschrieben, die als Basis für die geplanten Experimente zur Rekonstitution notwendig erschienen. In Abschnitt 3.1.1. soll eine spezifische Phospholipidumgebung des Carriers und in 3.1.2. eine Wechselwirkung des Carriers mit spezifischen Phospholipiden festgestellt und charakterisiert werden, um Vorstellungen von optimalen Phospholipid-Systemen in späteren Versuchen zur Rekonstitution zu bekommen. In Abschnitt 3.1.3. schließlich soll die Wirkung des zur Solubilisierung und Isolierung notwendigen Detergens 3-Lauramido-N,N-dimethylpropyl-aminoxid (LAPAO) auf die Phospholipidmembran und das Carrierprotein im natürlichen System untersucht werden.

3.1.1. Bestimmung der nach der Isolierung am Carrier haftenden Phospholipide

Da das isolierte Carrierprotein einen extrem hohen isoelektrischen Punkt von ca 9,8 aufweist (44), liegt die Annahme nahe, daß die kationischen Gruppen des Proteins in der Membran durch anionische Phospholipide neutralisiert werden. Die Kenntnis einer spezifischen Phospholipidumgebung um das Carrierprotein wäre sehr wichtig für spätere Rekonstitutionsexperimente.

Zur Klärung dieser Frage wurde nach der Methode von Riccio et al. (43,44) hochgereinigter CAT-Protein Komplex verschiedenen Methoden zur Extraktion der Phospholipide unterworfen:

- 1) Eine einfache Extraktion des solubilisierten Proteins mit Chloroform/Methanol führt nicht zum gewünschten Erfolg, da sowohl das Detergens als auch teilweise

das Protein in die organische Phase extrahiert werden und eine Auftrennung der einzelnen Phospholipide auf der Dünnschichtplatte stark behindern.

- 2) Die für proteinchemische Untersuchungen verwendete Methode zur Entfernung des Triton X-100 (64), die Extraktion des solubilisierten Proteins mit Äther oder Aceton, erwies sich als ungeeignet, da ein Großteil der neutralen Phospholipide mit in die organische Phase extrahiert wird und dadurch die geladenen Phospholipide scheinbar angereichert werden.
- 3) Zur Bestimmung der Phospholipide wurde daher eine kombinierte Methode entwickelt, die in Abb.6 beschrieben ist. Bei der Extraktion des Lyophilisats (Entfernung

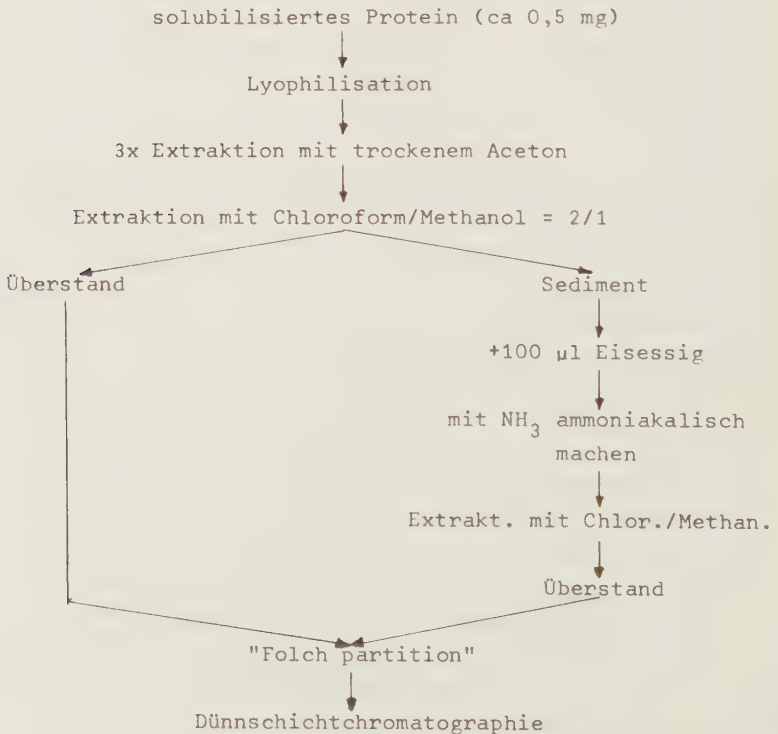


Abb.6 Analyse der an den Carrier gebundenen Phospholipide

von Triton) mit trockenem Aceton werden keine Phospholipide mitextrahiert. Der Rückstand der ersten Chloroform/Methanol-Extraktion wird zur Freisetzung der letzten Phospholipide mit Eisessig und Ammoniak behandelt. Die vereinigten Chloroform/Methanol-Extrakte wurden zur Abtrennung von mitextrahiertem Protein der "Folch partition" (65) unterworfen.

Die mit zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel aufgetrennten Phospholipide ergaben nach der Phosphatbestimmung die in Tab.I dargestellte Verteilung.

Phospholipid	am isolierten Carrierprotein	in Rinderherz-mitochondrien (25)
PC	45 %	44 %
PE	34 %	36 %
DPG	14 %	16 %
PI	6 %	4 %
Summe	ca 0,2 g Phospholipid/g Prot.	

Tab.I Zusammensetzung der mit dem Carrier isolierten Phospholipide

Offensichtlich entspricht diese Verteilung ziemlich exakt der durchschnittlichen Häufigkeit der betreffenden Phospholipide in der inneren Mitochondrienmembran (66). Es kann daraus jedoch nicht gefolgert werden, daß keine spezifische Wechselwirkung des Carriers mit negativ geladenen Phospholipiden stattfindet; die spezifisch gebundenen Phospholipide könnten während der Isolierung durch die Detergensbehandlung mit den gemischten Detergens/Phospholipid-Micellen äquilibriert worden sein, die natürlich die durchschnittliche Phospholipidverteilung enthalten.

3.1.2. Einfluß von Phospholipasen auf die Funktion des Adeninnucleotid-Carriers

Aus den gleichen Überlegungen heraus, wie sie in Abschnitt 3.1.1. dargestellt sind, wurde eine zweite, aufwendigere Methode angewandt, mit der eine Wechselwirkung des Carriers mit bestimmten Phospholipiden festgestellt werden kann.

3.1.2.1. Charakterisierung der verwendeten Phospholipasen

In den folgenden Untersuchungen wurde Phospholipase A_2 aus Schlangengift (*Crotalus adamanteus*) und Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas verwandt. Beide Enzyme (EC 3.1.1.4.) spalten bei Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen spezifisch die Fettsäure in der Position 2 am Glycerin ab. Die Reaktion führt zur Bildung von freien Fettsäuren und Lyso-Phospholipiden.

Bei beiden Enzymen wurde mit einem Verfahren nach Lin et al. (67) das Fehlen von proteolytischer Aktivität durch Verunreinigungen im käuflichen Produkt nachgewiesen.

Zum Test auf Wirkung und Spezifität gegenüber den Mitochondrien-Phospholipiden wurden die Phospholipasen in 2 mM $CaCl_2$ bei 37°C mit den Mitochondrien inkubiert und nach den angegebenen Zeiten durch Zugabe von 10 mM EGTA (68) und gleichzeitigem Abkühlen auf 0°C gestoppt. Anschließend wurden Aliquots mit Chloroform/Methanol = 2/1 extrahiert. Das Verhältnis der einzelnen Phospholipidarten und Lyso-Phospholipide nach der Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie wurde durch Phosphatbestimmung analysiert. Die Wirkung der beiden Phospholipasen auf die Mitochondrien-Phospholipide zeigt Abb.7, Abb.8 und Tab.II. Deutlich sind die unterschiedlichen Spezifitäten der beiden Phospholipasen zu erkennen:

Phospholipase A_2 aus Schlangengift : PE > PC >>> DPG

Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas : DPG > PE > PC.

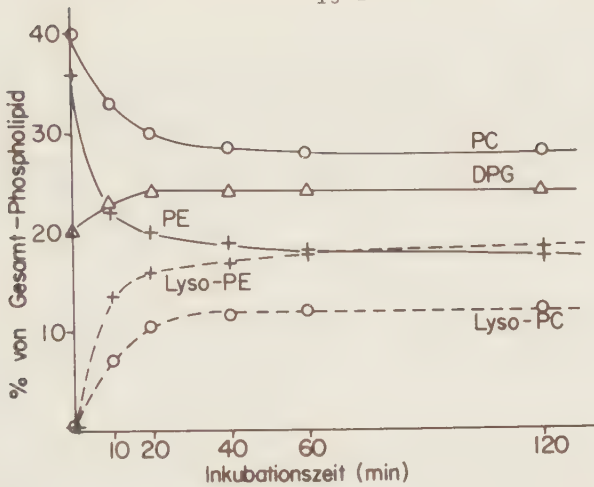


Abb. 7 Abbau von mitochondrialen Phospholipiden durch Phospholipase A_2 aus Schlangengift. Die Zusammensetzung der nach der Behandlung mit Phospholipase extrahierten Phospholipide ist in % der Gesamtmenge an extrahierten Phospholipiden angegeben.

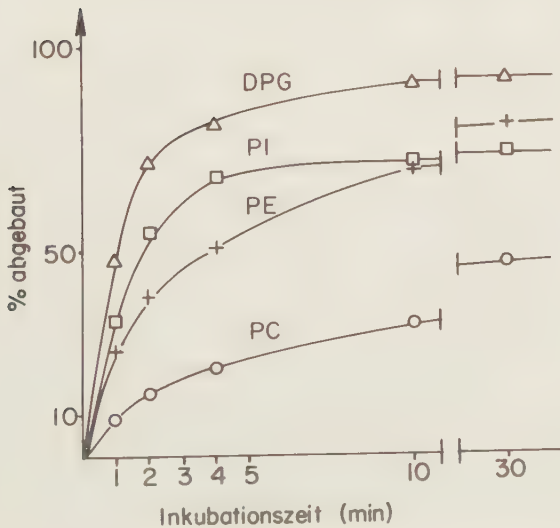


Abb. 8 Abbau von mitochondrialen Phospholipiden durch Phos-

pholipase A₂ aus Schweinepankreas. Der Anteil des abgebauten Phospholipids ist in % der ursprünglichen Menge der jeweiligen Phospholipidspezies angegeben.

		Inkubationszeit (min)									
		0	1	2	4	10	20	30	40	60	120
Schlangengift- Phospholipase	PC	1			8	16	25		28	29	30
	PE	1			20	37	43		46	50	50
	DPG	1			1	1	1		1	1	1
	Ges.PL	1			10	19	23		25	27	27
Pankreas- Phospholipase	PC	1	9	15	21	32		47			
	PE	1	26	39	51	70		81			
	DPG	1	48	72	81	91		92			
	PI	1	33	50	68	71		74			
	Ges.PL	1	22	34	43	57		68			

Tab.II Abbau von mitochondrialen Phospholipiden durch Phospholipase A₂. Die Zahlenwerte bedeuten : % abgebauten Phospholipid. (Phospholipase aus Schlangengift: 0,13 U/mg Protein, Phospholipase aus Schweinepankreas 0,15 U/mg Protein)

Für die weiteren Untersuchungen war es entscheidend, die Abbauprodukte des Phospholipasen aus der Membran zu entfernen, da die anwesenden freien Fettsäuren (anionische Komponenten, die eventuell mit der ADP-Bindungsstelle konkurrieren) und die Lyso-Phospholipide (Detergenswirkung) die Aktivität des Carriers drastisch hemmen (vgl. Abschnitt 3.1.2.3.).

Dies wurde durch Inkubation mit Rinderserum-Albumin (BSA) erreicht. Nach dem Stop mit EGTA wurden die Mitochondrien dreimal mit Puffer, der 1 % BSA enthielt, und anschließend einmal mit BSA-freiem Puffer gewaschen. Damit konnten die Lyso-Phospholipide sehr effektiv extrahiert werden, wie aus den Werten in Tab.III zu erkennen ist.

		Inkubationszeit (min)			
		0	5	30	60
Lyso-PC	- BSA	1	13	28	35
	+ BSA	1	1	2	2
Lyso-PE	- BSA	1	40	51	61
	+ BSA	1	5	4	5

Tab.III Extraktion von Lyso-Phospholipiden durch BSA.
Die Zahlenwerte bedeuten: % Lyso-PL in der Membran nach Phospholipasebehandlung und Waschen ⁺ BSA-
(Schlangengift-Phospholipase, 0,15' U/mg Protein)

3.1.2.2. Wirkung der Behandlung mit Phospholipase auf die Bindung von ADP an den Carrier

Bei diesen Untersuchungen ist es besonders wichtig, den Gehalt an endogenen Nucleotiden in den Mitochondrien zu verringern, da der entsprechende austauschbare Anteil der Adeninnucleotide ursprünglich etwa 10 - 100 mal größer ist als der Anteil, der an den Carrier gebunden ist, und dieser daher nicht direkt gemessen werden kann. Die erwünschte Verringerung der internen ADP- und ATP-Konzentrationen wurde mit den von Weidemann et al. (62) beschriebenen Methoden erreicht.

Der Einfluß der Phospholipase A₂ aus Schlangengift auf die spezifische Bindung von ADP an Mitochondrien (zur Be-

stimmung der spezifischen Bindung vgl. Abschnitt 2.6.) ist in Abb. 9 dargestellt. Bei der Auftragung nach Scatchard (69) ist erkennbar, daß durch die Behandlung mit Phospholipase die Bindungsfähigkeit drastisch sinkt, nach der Behandlung mit BSA jedoch wieder in etwa den natürlichen Wert erreicht. Zum Vergleich ist das Ergebnis nach Behand-

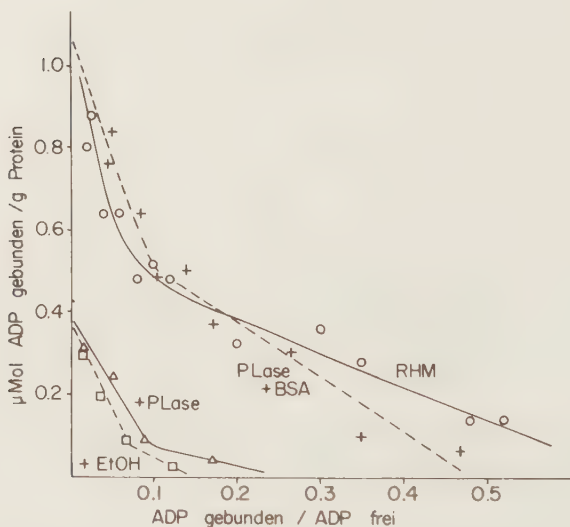


Abb. 9 Einfluß von Phospholipase A₂ aus Schlangengift auf die Bindung von ADP an Mitochondrien

lung mit 35 % Äthanol und nachfolgender BSA-Inkubation in die gleiche Abbildung einzutragen. Die membranschädigenden Einflüsse der durch Phospholipasen erzeugten Lyso-Phospholipide einerseits und des Äthanol andererseits bewirken eine ähnliche Verminderung der Fähigkeit der Mitochondrien, d.h. des Carriers, Adeninnucleotide zu binden. Die Reaktivierung durch BSA zeigt jedoch, daß die Bindungsfähigkeit

des Carrierproteins durch die Phospholipase nicht signifikant gelitten hat, während im Fall der Behandlung mit Äthanol eine irreversible Schädigung des Proteins eingetreten ist.

3.1.2.3. Wirkung der Phospholipasen auf den Transport von Adeninnucleotiden

Der Versuchsablauf zur Messung der Wirkung von Phospholipasen auf den Transport von Adeninnucleotiden in Mitochondrien aus Rattenlebern zeigt Abb.10. Die umständlichere

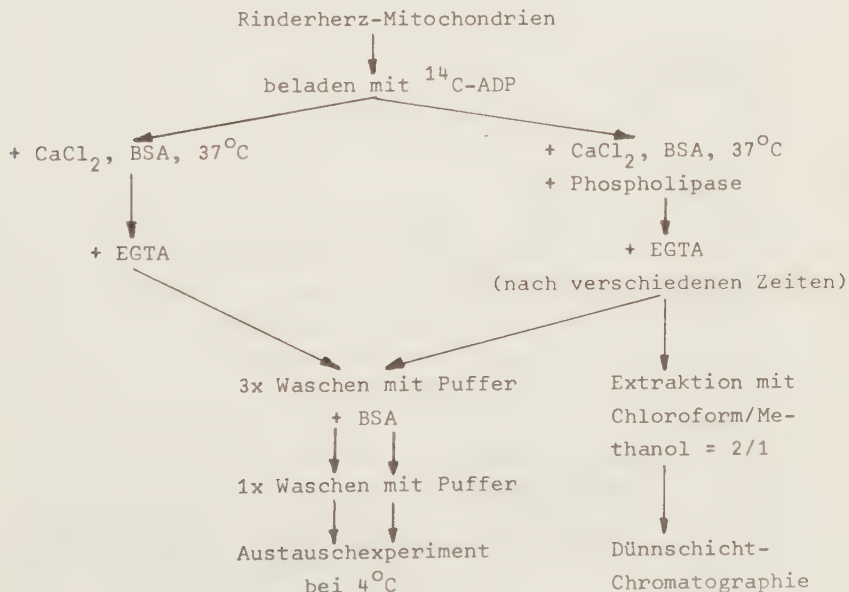


Abb.10 Messung der Wirkung von Phospholipase auf den Austausch von Adeninnucleotiden

und teurere Methode der Beladung mit radioaktivem ADP vor der Behandlung mit Phospholipase ist notwendig, da durch die Enzymeinwirkung der Gehalt an endogenem Nucleotid sinkt. Somit hätte man bei nachträglicher Inkubation mit radioaktivem Nucleotid in unbehandelten und behandelten Mitochondrien verschiedene spezifische Aktivitäten des endogenen Nucleotids und käme damit zu falschen Ergebnissen. In jedem Experiment wurde das Ausmaß der hydrolytischen Spaltung jeder Phospholipidspezies durch Extraktion, Dünnschicht-Chromatographie und Phosphatbestimmung gemessen und in Abb.11 und Tab.IV für die beiden verwendeten Phospholipasen mit der gefundenen Aktivität des Austausches

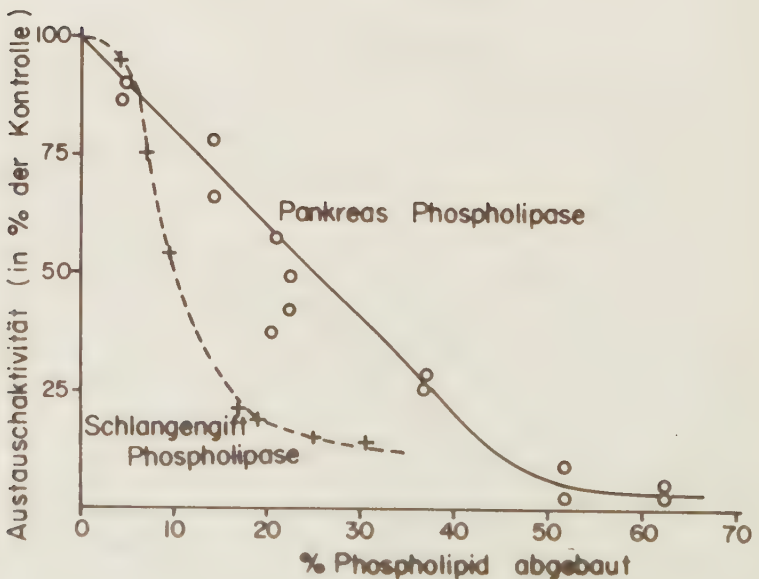


Abb.11 Wirkung von Phospholipasen auf den Austausch von Adennucleotiden in Rattenleber-Mitochondrien

	Nr.	PL-Abbau in %				Austauschgeschwindigkeit in % der Kontrolle
		PC	PE	DPG	Ges.	
Schlangengift- Phospholipase	1	4	7	-	4	95
	2	6	12	-	7	74
	3	8	14	-	9,5	53
	4	14	23	-	17	21,5
	5	17	25	-	19	17,5
	6	27	33	-	25	15,5
	7	33	37	-	29	14
Pankreas- Phospholipase	8	3	5	8	4,5	87
	9	11	18	24	14,5	78
	10	15	26	36	21	57
	11	18	27	37	23	49
	12	29	44	60	37,5	28
	13	45	55	85	52	4
	14	54	64	89	63	4

Tab. IV Wirkung der Phospholipasebehandlung auf den Austausch von Adeninnucleotiden

korreliert. Da in diesen Experimenten die spezifische Aktivität der Nucleotide nicht bekannt war, wurde in jedem Experiment die Anfangsgeschwindigkeit des Austausches bei unbehandelten Mitochondrien (Kontrollansatz) gleich 100 % gesetzt und die Raten der mit Phospholipase behandelten Mitochondrien darauf bezogen. Es ist zu beachten, daß das auf der Abszisse von Abb. 11 aufgetragene Ausmaß des Phospholipidabbaus sich für die beiden Phospholipasen aus völlig verschiedenen Anteilen der einzelnen abgebauten Phospholipide zusammensetzt. Eine Behandlung mit BSA nach der Einwirkung der Phospholipasen war in jedem Fall notwendig, da die Aktivität des Austausches ohne nachfolgendes Waschen mit albuminhaltigem Puffer minimal waren.

Trotz der unterschiedlichen Spezifitäten der beiden Phospholipasen zeigen diese in der Wirkung auf den Adeninnucleotidaustausch keine ähnlich großen Differenzen. Entgegen den Erwartungen der spezifischen Beteiligung von Cardiolipin an der Carrierumgebung und dem daraus zu folgernden größeren Einfluß der Phospholipase aus Schweinepankreas scheint eher die Phospholipase aus Schlangengift eine stärkere Hemmwirkung auf den Austausch von Adeninnucleotiden auszuüben. Die beobachteten Unterschiede dürften eher auf die unterschiedliche Fähigkeit der Phospholipasen zurückzuführen sein, die innere Schicht der Phospholipidmembran anzugreifen (70,71). Während die Phospholipase A₂ aus Schweinepankreas dazu in der Lage ist, greift die Phospholipase auf Schlangengift nur die äußere Hälfte der Phospholipid-Doppelschicht an.

Die Untersuchungen zum Einfluß der Phospholipasen auf den Adeninnucleotid-Carrier lassen somit Schlüsse auf die Aktivität des Carriers in verschiedenen Membranzuständen und auf die Wechselwirkung des Carriers mit Phospholipiden im allgemeinen zu, offensichtlich jedoch können keine Schlüsse auf spezifische Phospholipidumgebung des Adeninnucleotid-Carriers oder seine Abhängigkeit von bestimmten Phospholipiden gezogen werden.

3.1.3. Wirkung von Detergentien auf den Transport von Adeninnucleotiden in Mitochondrien

3.1.3.1. Versuchsgrundlagen

Bei den unter 3.3. und 3.4. beschriebenen Versuchen zur Rekonstitution der Inhibitorbindung und des Austausches von Adeninnucleotiden wird mit der Inkorporation des solubilisierten Carrierproteins zwangsläufig auch das Detergens LAPAO mit in die Membran eingebaut. Um die Einflüsse

dieses Detergens auf die Funktion des Carriers im rekonstituierten System abschätzen zu können, wurden die Wirkungen des Detergens auf den Transport von Adeninnucleotiden im natürlichen System untersucht (72). Damit sollte auch entschieden werden können, ob die Inkorporation von Detergensmolekülen in die Phospholipidmembran einen irreversiblen denaturierenden Effekt auf das Protein ausübt oder nur mittelbar über die Veränderung der Membranstruktur einen hemmenden Einfluß auf die Carrierfunktion bewirkt, der dann zumindest teilweise reversibel sein müßte.

3.1.3.2. Einfluß von LAPAO auf die Aktivität des Carriers

In Abb.12 ist die Wirkung von LAPAO auf das spezifische Innenvolumen der Mitochondrien und auf den Austausch von Adeninnucleotiden aufgetragen. Die Wirkung auf die

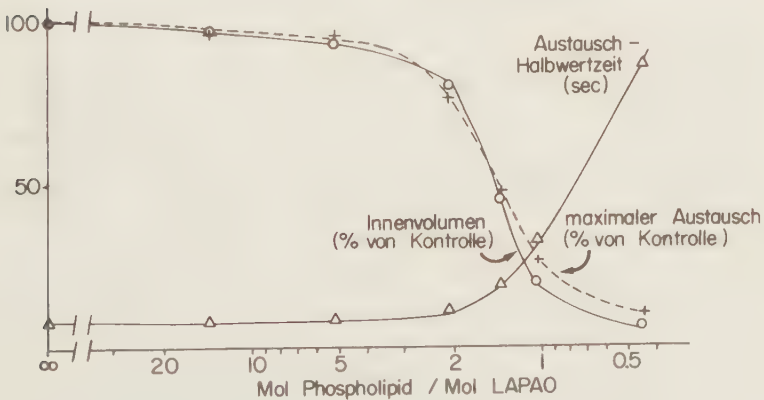


Abb.12 Wirkung von LAPAO auf Mitochondrien

Membran (Innenvolumen der Mitochondrien) entspricht den Untersuchungen, die mit Liposomen durchgeführt wurden (Abb.21). Zusätzlich tritt noch eine direkte Wirkung auf

die Funktion des Carriers auf, die am Ansteigen der Halbwertszeit des Austausches mit steigender Konzentration von LAPAO sichtbar wird.

3.1.3.3. Versuche zur Reaktivierung des Austausches

Um die Möglichkeit der Reaktivierung - wie in Abschnitt 3.1.3.1. beschrieben - zu testen, müßte das Detergens wieder aus der Membran entfernt werden. Dies ist jedoch mit den nichtionischen Detergentien, die kaum dialysierbar sind, ein großes Problem. Da die direkte Entfernung des Detergens nicht möglich ist, wurde ein anderer Weg beschritten: Aus Untersuchungen mit der NMR-Spektroskopie (45) ist bekannt, daß LAPAO-Moleküle zwischen Liposomen ausgetauscht werden können. Die mit LAPAO behandelten Mi-

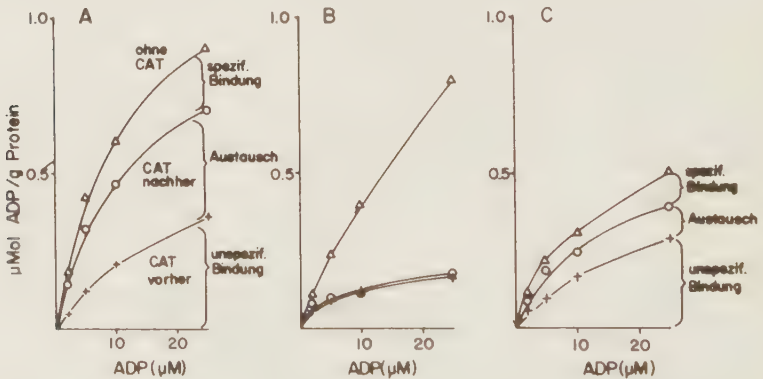


Abb.13 Reaktivierung des Austausches von Adeninnucleotiden in Rinderherz-Mitochondrien durch Zugabe von Phospholipiden. Die Bestimmung der drei Anteile (spezifische und unspezifische Bindung, Austausch) der ADP-"Bindung" erfolgt nach (62). In Versuch B, d.h. nach der Behandlung mit Phospholipase, ist kein Austausch meßbar.

tochondrien wurden mit einem Überschuß an Phospholipid-Vesikeln inkubiert und dadurch die ursprünglich hohe Detergengkonzentration in der Mitochondrienmembran herabgesetzt.

In Abb.13 ist zu erkennen, daß tatsächlich eine gewisse Reaktivierung des Austausches durch die Inkubation mit Liposomen eintritt. Dabei ist es entscheidend, eine optimale Menge an zugesetztem Phospholipid zu verwenden, wie Abb.14 zeigt. Einen Überblick über die Inaktivierung durch LAPAO und die anschließende Reaktivierung durch den Zusatz von Liposomen gibt Abb.15. Schon auf die Ausbeute an mitochondrialem Protein nach den einzelnen Waschschritten (vgl. Legende zu Abb.15) übt die Inkubation mit Liposomen eine positive Wirkung aus. Der anfängliche Abfall des Proteingehaltes ist wohl durch den Verlust von Matrixprotein zu erklären. Die Werte des Austausches (2 min Inkubationsdauer) zeigen deutlich den reaktivierenden Einfluß der

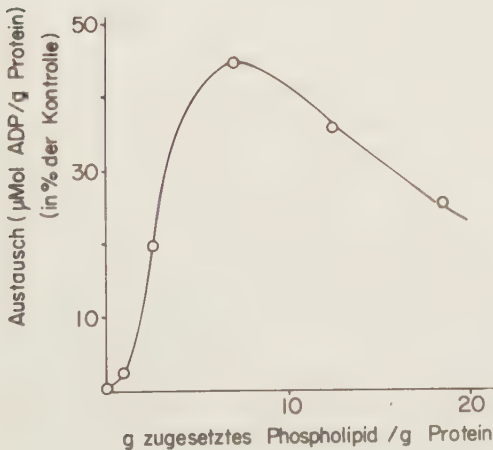


Abb.14 Abhängigkeit der Reaktivierung vom Phospholipid/Protein Verhältnis

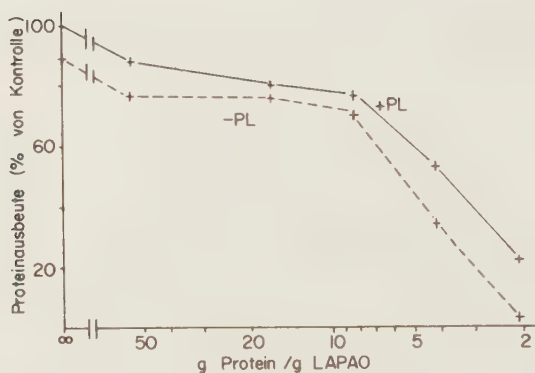


Abb. 15a

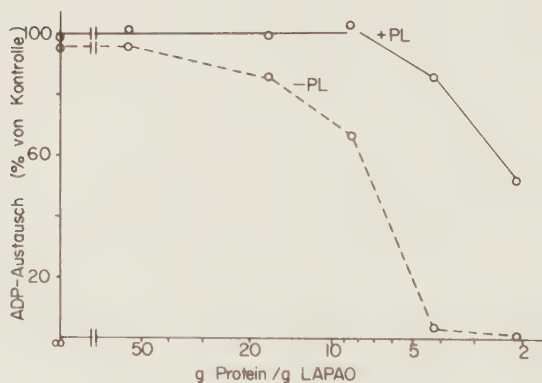


Abb. 15b Einfluß der Zugabe von Phospholipid (Liposomen) auf Proteinausbeute und Austauschaktivität. Sowohl der Kontrollansatz (ohne Phospholipase) als auch die mit Phospholipase behandelten Mitochondrien wurden 2x mit Liposomen und 2x mit Puffer ohne Liposomen gewaschen.

a) Einfluß auf die Proteinausbeute
b) Einfluß auf die Austauschaktivität

nachfolgenden Inkubation mit Phospholipid-Vesikeln.

Die Inkorporation von LAPAO in die Mitochondrienmembran bewirkt folglich nicht nur eine Schädigung der Membranstruktur sondern auch eine damit verbundene Hemmung der Funktion des Adeninnucleotid-Carriers. Dieser Hemmeffekt besteht jedoch nicht in einer irreversiblen Denaturierung des Carrierproteins, wie durch die beschriebenen Reaktivierungsversuche gezeigt wurde. Obwohl das System offensichtlich sehr empfindlich gegen Störungen der Phospholipidmembran durch Detergentien zu sein scheint, lassen die teilweise erfolgreichen Reaktivierungen im mitochondrialen System eine günstige Prognose für die Versuche zur Rekonstitution im künstlichen System zu.

3.2. Isolierung und Charakterisierung des Adeninnucleotid-Carriers (73,74)

3.2.1. Isolierung des unbeladenen Carrierproteins

Die von Riccio et al. (43,44) beschriebene Methode zur Isolierung des CAT-Protein Komplexes eignet sich nicht direkt zur Gewinnung eines für die Rekonstitution aktiven Proteins, da der Inhibitor CAT fest an das Protein gebunden bleibt. Die naheliegende Idee, das Protein ohne gebundenes CAT mit der gleichen Methode zu isolieren, führt zu keinem brauchbaren Ergebnis (Tab.V, Zeile 5). Nach Versuchen mit mehreren nichtionischen und ionischen Detergentien erwies sich das nichtionische, aber polare 3-Lauramido-N,N-dimethylpropyl-aminoxid (LAPAO) als sehr geeignet für die Isolierung des unbeladenen Adeninnucleotid-Carriers. Die solubilisierende Wirkung von Triton X-100 und LAPAO auf Mitochondrien aus Rinderherzen, die mit ^{35}S -CAT vorbeladen worden waren, zeigt Abb.16. Die Freisetzung von

Mitochondrien beladen mit	solubili- sierendes Detergens	% des Gesamtproteins im Durchlauf	Liganden- bindung $\mu\text{Mol/g Prot}$	errechnete Reinheit in %
CAT	Triton	9,4	13-14	75
	LAPAO	10,1	13-14	75
BKA	Triton	10,5	- 1)	
	LAPAO	9,6	13-14	75
-	Triton	4,9		40
	LAPAO	8,9		70-75

Tab.V Chromatographie verschiedener Carrierformen auf Hydroxylapatit.

1) Dieser Wert ist wegen unspezifischer Adsorption von BKA nicht direkt meßbar.

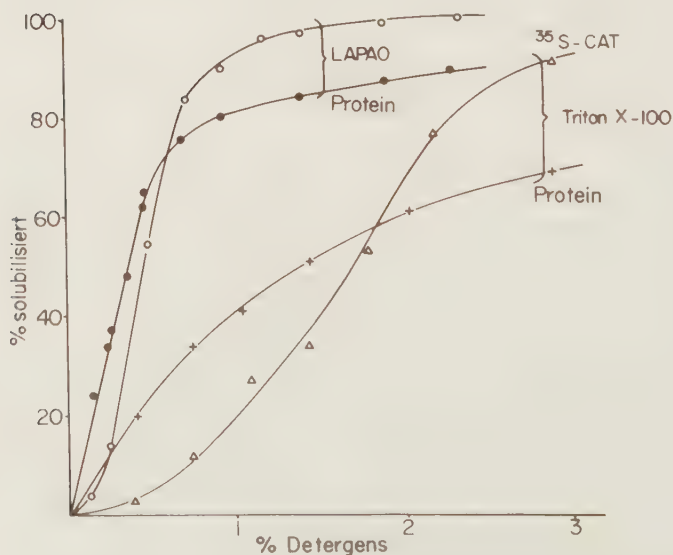


Abb.18 Solubilisierung von mitochondrialen Proteinen durch Triton X-100 und LAPAO

^{35}S -CAT durch die Detergentien entspricht der Freisetzung des CAT-Protein Komplexes. Dies wurde geprüft, indem das Solubilisat einer Gleichgewichtsdialyse unterworfen wurde; dabei konnte mehr als 90 % des ^{35}S -CAT dem fest bindenden CAT-Protein Komplex zugeordnet werden. Bei der Solubilisierung (Abb.16) ist LAPAO schon bei bedeutend geringeren Konzentrationen wirksam, verglichen mit Triton X-100. Für optimale Solubilisierungsbedingungen ist eine relativ hohe Ionenstärke (100 mM Na_2SO_4) notwendig. Zwischen pH 6,5 und 8,0 ist die Auflösung vom pH nahezu unabhängig. Die Standardbedingungen zur Extraktion des Carrierproteins (1 % LAPAO, 100 mM Na_2SO_4 , pH 7,5) bewirken eine Solubilisierung von mehr als 80 % des mitochondrialen Proteins und mehr als 90 % des Carrierproteins.

In der gleichen Weise wie der CAT-Protein Komplex kann mit beiden Detergentien auch der BKA-Protein Komplex isoliert werden.

Die Freisetzung des inhibitorfreien Proteins zeigt annähernd identische Abhängigkeiten von Detergens- und Salzkonzentration wie der CAT-Protein Komplex. In diesem Fall jedoch, bei der Isolierung des unbeladenen Carriers, kann das Protein nur mit LAPAO in nicht denaturierter Form und guter Ausbeute isoliert werden, während bei Anwendung von Triton X-100 das Protein in wenigen Minuten denaturiert wird.

Zur Reinigung des mit LAPAO solubilisierten ADP,ATP-Carriers können die gleichen Schritte angewandt werden, wie sie von Riccio et al. (44) zur Reinigung des CAT-Protein Komplexes mit Triton X-100 beschrieben wurden. Nach dem ersten Chromatographieschritt auf Hydroxylapatit findet man die nicht denaturierte Form des Carrierproteins im Durchlauf der Säule, während fast alle anderen Proteine an das Säulenmaterial adsorbiert werden. In Tab.V ist gezeigt, daß mit Triton X-100 nur bei Anwesenheit der Inhibitoren CAT oder BKA das Carrierprotein im Durchlauf der

Säule angereichert werden kann. Mit LAPAO jedoch erhält man auch mit Extrakten von unbeladenen Mitochondrien gleiche Proteinausbeuten wie mit inhibitorbeladenen Mitochondrien; und zwar ungefähr 10 % des Proteins der inneren Mitochondrienmembran, in Übereinstimmung mit Ergebnissen von CAT-beladenen Mitochondrien (44) und mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (75,77).

Der Proteinanteil des Carriers im Durchlauf der Hydroxylapatit-Säule kann mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durch das Auftreten des Polypeptids mit Molekulargewicht 30 000 bestimmt werden. Offensichtlich tritt sowohl bei der Isolierung des CAT-Protein Komplexes

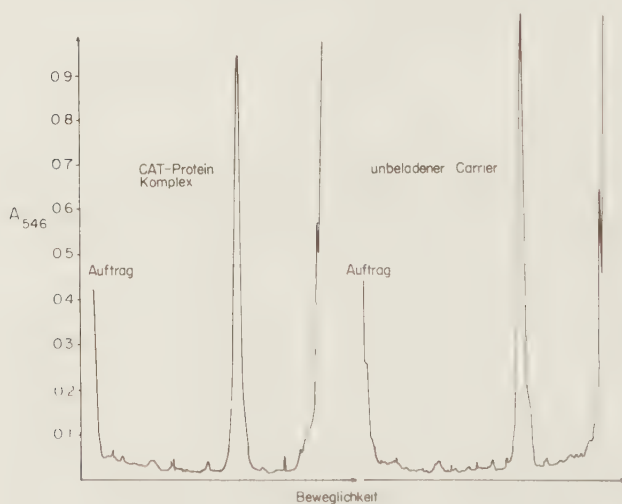


Abb.17 Isolierung von CAT-Protein Komplex und unbeladenem Carrierprotein.

Densitometrische Messung der Polyacrylamidgele bei 546 nm. Die starke Absorption an der Gelfront stammt von dem angefärbten Detergens LAPAO. Molekulargewichtsbestimmungen bei (44).

mit Triton X-100 und des unbeladenen Carrierproteins mit LAPAO das gleiche Polypeptidmuster in SDS-PAGE auf (Abb.17). Das Protein, das mit LAPAO aus unbeladenen Mitochondrien isoliert wurde, weist eine kleine zusätzliche Schulter bei einem Molekulargewicht von etwa 27 000 auf. Diese Komponente entsteht wahrscheinlich durch proteolytischen Abbau aus dem Carrierprotein (s.u.).

Die spezifische Bindung des Inhibitors im isolierten CAT-Protein Komplex und BKA-Protein Komplex nach der Reinigung auf Hydroxylapatit wurde in beiden Fällen bestimmt (Tab.V). Mit Triton X-100 ist eine Messung der BKA-Bindung nicht möglich, da das freie BKA weitgehend in den Triton-Micellen gelöst ist, die mit dem Protein auf der Säule überlappen. Unter der Annahme, daß der hochgereinigte CAT- oder BKA-Protein Komplex ca 18 μ Mol Inhibitor/g Protein bindet (44,78), kann errechnet werden, daß der Ligand-Protein Komplex ca 75 % des Proteins im Durchlauf der Hydroxylapatit-Säule ausmacht. Mit diesem Wert kann die Polypeptidbande mit Molekulargewicht 30 000 in SDS-PAGE standardisiert werden. Durch Vergleich der Extrakte aus unbehandelten und CAT-beladenen Mitochondrien konnte der Gehalt an reinem, ligandenfreien Carrier im Durchlauf der Hydroxylapatit-Säule zu ca 70 % extrapoliert werden.

3.2.2. Stabilität des isolierten Carrierproteins

Zur weiteren Reinigung des CAT-Protein Komplexes wurde von Riccio et al. (44) eine Gelfiltration auf Sepharose 6B verwandt. Mit dem unbeladenen Protein tritt jedoch eine neue Schwierigkeit auf: Das Carrierprotein wird während des Säulenlaufes in beträchtlichem Ausmaß abgebaut, dabei tritt die schon oben erwähnte Schulter bei einem Molekulargewicht von 27 000 in verstärktem Maße auf (Abb.18c). Dieses Ergebnis soll durch vergleichende Untersuchungen zur Sta-

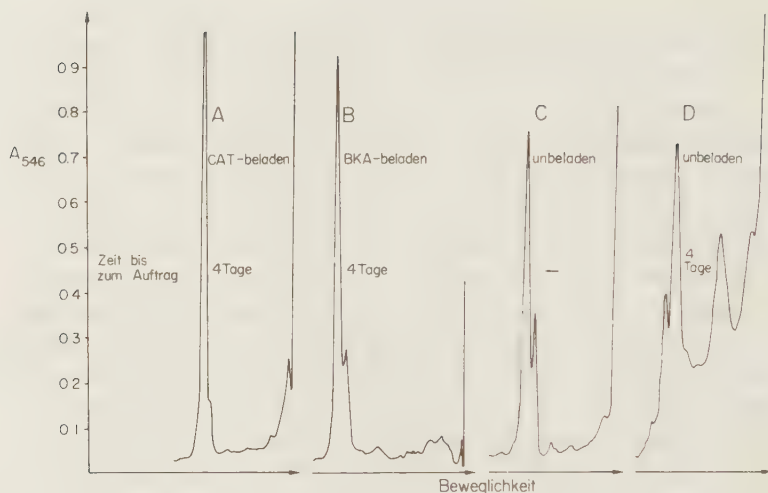


Abb.18 Stabilität verschiedener Formen des Adeninnucleotid-Carriers (weitere Erläuterungen wie Abb.17)

bilität der drei Proteinformen gegen Denaturierung weiter erläutert werden. Diese drei Formen (CAT-Protein Komplex, BKA-Protein Komplex, unbeladenes Carrierprotein) wurden nach der Solubilisierung mit LAPAO und der Isolierung über Hydroxylapatit auf Sepharose 6B gereinigt. Nach viertägigem Stehen bei 4°C wurden die verschiedenen Proteinformen mit SDS-PAGE analysiert (Abb.18). Wie an den Proteinfärbungen zu sehen, ist der CAT-Protein Komplex am stabilsten, gefolgt vom BKA-Protein Komplex, während das unbeladene Protein sehr instabil ist und zu mindestens drei kleineren Polypeptiden abgebaut wird. Zusammen mit Untersuchungen zur Stabilität der mit Triton X-100 isolierten Proteinkomplexe (78) kann die Empfindlichkeit gegen proteolytischen Abbau in der folgenden Reihe abnehmender Labilität abgestuft werden:

Unbeladenes Protein (Triton) > Unbeladenes Protein (LAPAO) > BKA-Protein Komplex (LAPAO) > BKA-Protein Komplex (Triton) > CAT-Protein Komplex (LAPAO) > CAT-Protein Komplex (Triton).

Das unbeladene, mit Triton extrahierte Carrierprotein ist offensichtlich zu instabil, um die Isolierungsschritte zu überdauern. Zugabe von Diisopropyl-fluorophosphat bei der Isolierung hatte keinerlei hemmende Wirkung auf das Auftreten der Polypeptidbande mit Molekulargewicht 27 000.

Um das Ausmaß des Proteinabbaus im Fall des mit LAPAO isolierten Carriers zu vermindern, wurde auf den zweiten Schritt der Reinigung (Sepharose 6B) verzichtet. Zur Beschleunigung der Isolierung wurde bei den meisten Experimenten für die Adsorptionsschromatographie mit Hydroxylapattit ein "batch-Verfahren" benutzt, das die Zeit, die für die Isolierung benötigt wird, von ca 3 Stunden auf etwa 20 - 30 min verkürzt. Das Carrierprotein, das nach diesem Verfahren isoliert wurde, zeigt in den folgenden Rekonstitutionsexperimenten eine deutlich bessere Aktivität.

3.2.3. Weitere Charakterisierung des Carrierproteins

Um die Identität des CAT-Protein Komplexes mit dem unbeladenen Carrierprotein bezüglich des Proteinanteils eindeutig zu beweisen, wurde eine Reihe von weiteren Experimenten durchgeführt:

- 1) Bei der Coelektrophorese (SDS-PAGE) dieser zwei Proteinpräparationen war nur eine einzige Polypeptidbande mit einem Molekulargewicht von 30 000 sichtbar.
- 2) Die Aminosäureanalyse (Tab.VI) beider Proteine zeigte im Rahmen der Meßgenauigkeit eine identische Zusammensetzung.
- 3) Weitere Beweise konnten durch immunologische Untersuchungen gewonnen werden (79). Abb.19 zeigt die Reaktion des CAT-Protein Komplexes und des unbeladenen Carriers mit Antikörpern gegen den isolierten CAT-Protein Komplex. In diesem Ouchterlony-Test reagierten beide Proteine in gleichem Ausmaß.
- 4) Noch klarer konnte die Identität der antigenen Determinanten in einer verfeinerten immunologischen Analyse

Aminosäure	CAT-Protein Komplex (Triton)	CAT-Protein Komplex (LAPAO)	unbeladenes Carrierprot. (LAPAO)
Asx	7,72	8,42	8,56
Thr	4,72	4,90	5,20
Ser	5,25	5,26	5,52
Glx	7,45	8,47	8,16
Pro	3,10	3,61	3,52
Gly	11,39	10,76	10,74
Ala	11,89	11,39	11,38
Val	7,94	8,16	8,04
Cys	1,77	1,66	1,57
Met	2,76	2,74	2,64
Ile	5,85	5,07	5,66
Leu	8,46	8,55	8,46
Tyr	5,08	4,77	4,36
Phe	7,03	6,54	6,15
His	0,83	0,93	0,99
Lys	3,26	3,40	3,36
Arg	5,49	5,39	5,68

Tab.VI Aminosäureanalyse des CAT-Protein Komplexes und des unbeladenen Carrierproteins. Die Zahlenwerte bedeuten : Anteil der einzelnen Aminosäure in % der Summe (Asx = Asp + AsN, Glx = Glu + GLN)

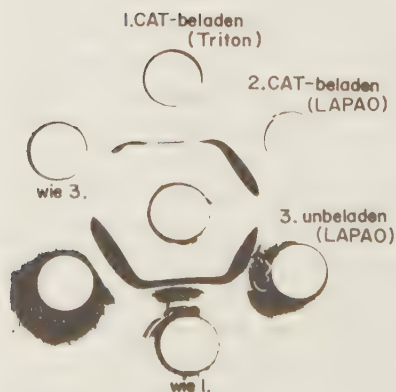


Abb.19 Reaktion des CAT-Protein Komplexes und des unbe-

ladenen Carrierproteins mit Antikörpern.

Zugaben: Mitte: 5 μ l CAT-Protein Antikörper (69 mg/ml),

Außen: Je 5 μ l der folgenden Präparationen: 1) CAT-Protein Komplex (Triton), 2) CAT-Protein Komplex (LAPAO), 3) unbeladenes Carrierprotein. Alle anderen Bedingungen wie bei (79).

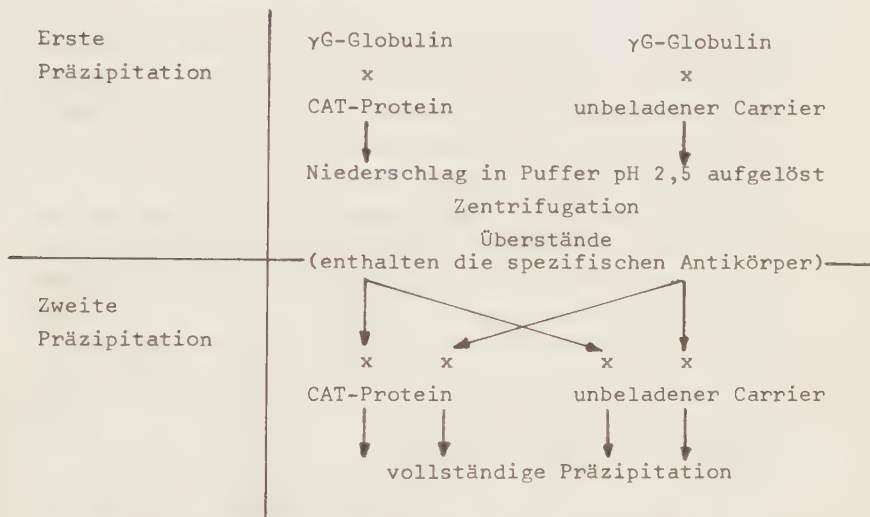


Abb.20 Identität der antigenen Determinanten des CAT-Protein Komplexes und des unbeladenen Carrierproteins

bewiesen werden. In dem Versuch, der in Abb.20 dargestellt ist, bewirkten die durch die erste Präzipitation und Wiederauflösung bei pH 2,5 (100) hochgereinigten Antikörper jeweils vollständige Präzipitation beider Proteinformen.

3.3. Rekonstitution der Bindungseigenschaften des Adenin-nucleotid-Carriers (80)

3.3.1. Inkorporation des Carrierproteins in die Liposomenmembran

Kleine Mengen von Detergentien (Triton X-100, LAPAO) werden in die Phospholipidmembran von Liposomen aufgenommen, ohne die Vesikelmembran zu zerstören. Die Aufnahme von LAPAO wurde von Beyer et al. (45) in Übereinstimmung mit Berichten von Inoue und Kitagawa (81) über die Wechselwirkung von Triton X-100 mit Liposomen durch NMR-Untersuchungen charakterisiert. Steigende Mengen von Detergentien zerstören schließlich die vesikuläre Struktur und machen das innere Volumen zugänglich. Genaue Untersuchungen der Wirkungen von Detergens und Protein auf die Liposomen sind wichtig für die folgenden Rekonstitu-

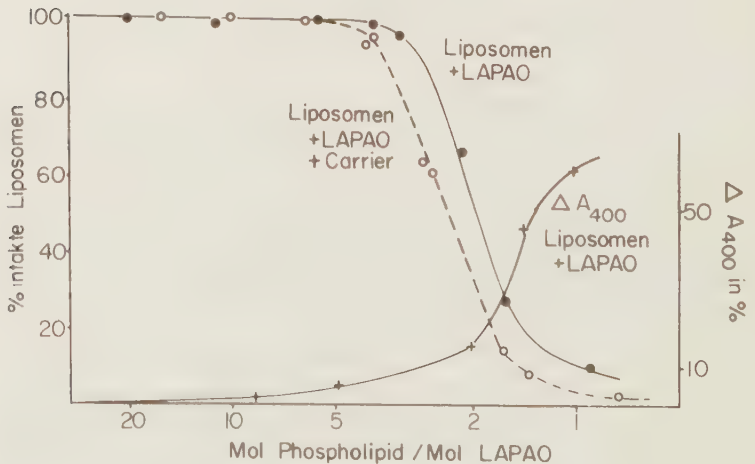


Abb. 21 Wirkung von LAPAO auf Liposomen

tionsexperimente, damit die Intaktheit der Vesikel in diesen Versuchen gesichert ist. In Abb.21 wurde das gemessene innere Volumen der Vesikel, das der Menge an intakten Liposomen entspricht, und die Absorption bei 300 nm (d.h. Streuung, abhängig von der Vesikelgröße) gegen das molare Verhältnis von Phospholipid zu LAPAO bei steigender Detergenszugabe aufgetragen. Die Vesikel brechen offensichtlich bei einem genau definierten Verhältnis Phospholipid/Detergens zusammen. Die gleichzeitig zunehmende Streuung zeigt die Bildung von größeren vesikulären und multilamellaren Strukturen an. Auch diese Befunde wurden durch Untersuchungen mit NMR-Spektroskopie von Beyer et al. (45) bestätigt. Zusätzliche Anwesenheit von isoliertem Carrierprotein hat nur sehr geringen Einfluß auf die kritische Detergenskonzentration, die zum Zusammenbruch der Liposomen führt. In den folgenden Experimenten zur Inkorporation in die Liposomen wurde jeweils nur so viel solubilisiertes Protein (mit LAPAO!) zugegeben, daß das Verhältnis Phospholipid/LAPAO den Wert von 15 nicht unterschritt. Bei diesem Wert sind die Liposomen nach Abb.21 noch intakt.

Die Bindung von isoliertem Carrierprotein an die Liposomen kann durch Chromatographie auf Sepharose 6B gezeigt werden (Abb.22). Abb.22b verdeutlicht die Schwierigkeit, die durch die Notwendigkeit des Detergens zur Solubilisierung des Proteins entsteht: Liposomen können nicht in Puffer, der LAPAO enthält, chromatographiert werden; das isolierte Carrierprotein wiederum kann in detergensfreiem Puffer nicht ohne Präzipitation chromatographiert werden. In Puffer ohne LAPAO (Abb.22b) erscheint das Protein mit einer zusätzlichen Schulter, die wahrscheinlich aggregiertes Protein enthält, das bei höherem Molekulargewicht eluiert wird. Nach der Inkubation mit Liposomen (Abb.22c) wird das gesamte Protein zusammen mit den Liposomen eluiert. Dieser Befund beweist zwar noch nicht sicher eine Inkorporation, aber er spricht zumindest für eine feste

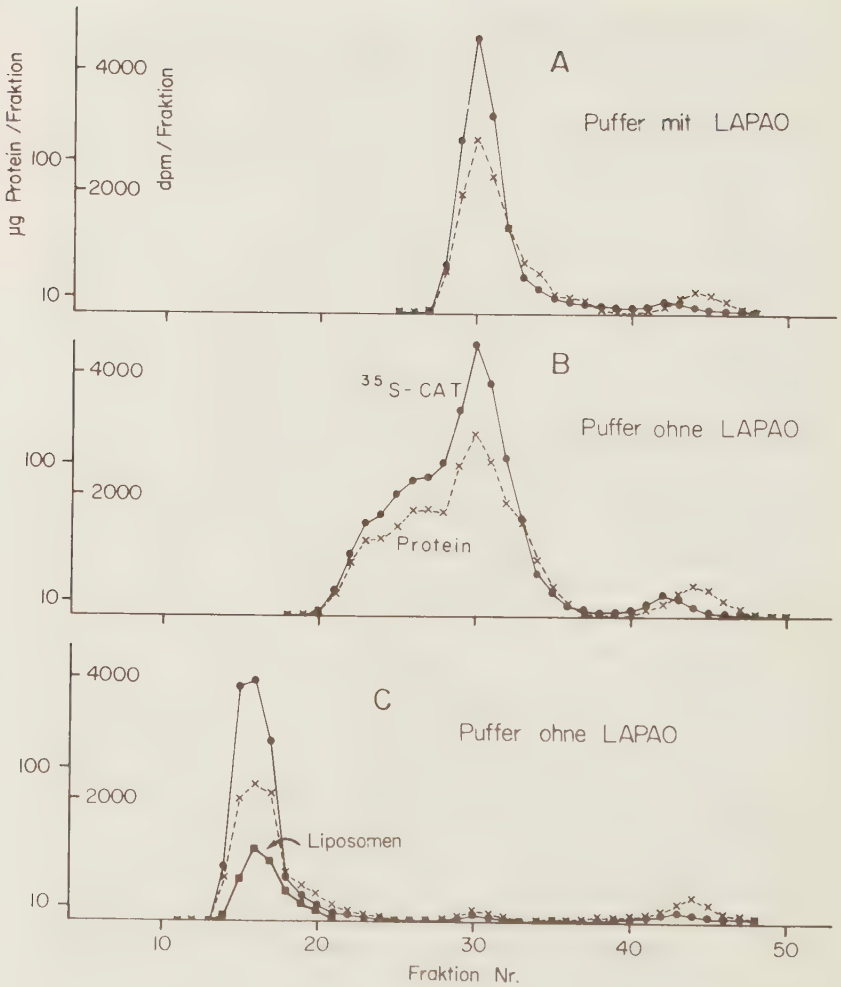


Abb.22 Inkorporation des Carrierproteins in Liposomen

Bindung des Carriers an die Liposomen. Ähnliche Ergebnisse, wie sie in Abb.22 für den CAT-Protein Komplex gefunden wurden, zeigten auch Experimente mit dem unbeladenen Carrierprotein.

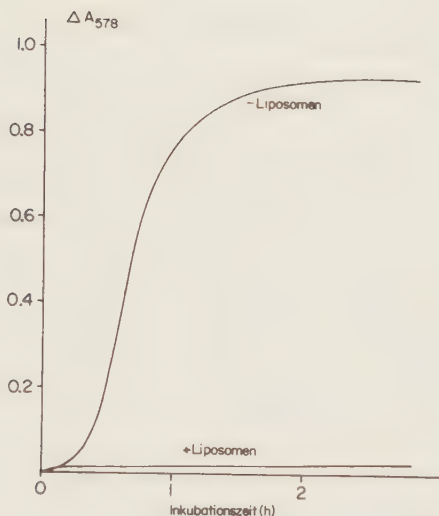


Abb.23 Immunologischer Nachweis des Carriereinbaus
Der Carrier wurde mit oder ohne Liposomen bei 30°C in einer Küvette inkubiert (5 min). Nach der Zugabe des Antikörpers wird die Absorption bei 578 nm (Bildung des Präzipitats) aufgezeichnet.

Die Reaktion mit Antikörpern ermöglicht einen spezifischeren Test für die Inkorporation. In Abb.23 wurde die Reaktion des Antikörpers gegen den CAT-Protein Komplex (79) mit dem isolierten unbeladenen Carrierprotein durch Messung der Absorptionzunahme bei der Präzipitatbildung in einer Küvette aufgezeichnet. Das isolierte Protein reagiert eindeutig mit dem Antikörper, während in Anwesenheit von Liposomen keine Reaktion zu beobachten ist. Dieser Befund spricht ebenfalls für eine vollständige Inkorporation des Carrierproteins in die Phospholipid-Vesikel.

3.3.2. Rekonstitution der CAT-Bindung

Die Eigenschaften des Adeninnucleotid-Carriers nach seiner Isolierung und dem Einbau in Phospholipidmembranen wurden zuerst mit Hilfe des spezifischen und fest gebundenen Inhibitors CAT mit dem mitochondrialen System verglichen. ^3H -CAT wurde entweder zum isolierten oder zum liposomen-gebundenen Carrierprotein gegeben. Die Art der Bindung zeigt Abb.24 in einem Scatchard Plot (69). Diese

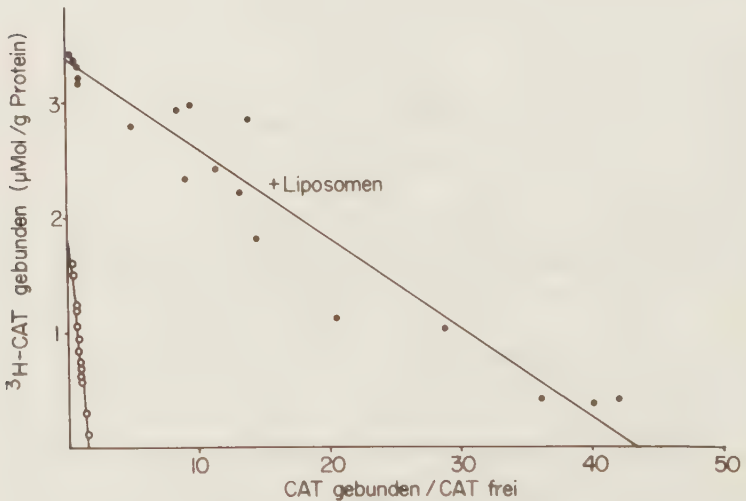


Abb.24 Bindung von ^3H -CAT an den Adeninnucleotid-Carrier

Daten werden in Tab.VII mit der Bindung von CAT an intakten Mitochondrien verglichen (Werte aus (82)). Die Werte für die maximale Bindung (C_0) wurden zur besseren Vergleichsmöglichkeit zwischen den beiden Systemen auf reines Carrierprotein umgerechnet. Für die Bindung an Mitochondrien wurde der Gehalt an Carrierprotein zu 9-10 % des mitochondrialen Proteins angenommen (43,44); die-

CAT-Bindung an	in Puffer	C _O (μMol/g)	K _d (nM)
Rinderherzmitochondrien	1	14 - 18	12
	2	9,5	15
solubil. Carrier- protein	-	2	1,6
+ Liposomen	2	3,5 ¹⁾	10

Tab.VII Bindung von CAT an den Adeninnucleotid-Carrier
Puffer 1: 0,25 M Sucrose, 0,5 mM EDTA, 2,5 mM
MgCl₂, 20 mM Morpholinopropan-Sulfonsäure, pH 6,8;
Puffer 2: 0,1 M Na₂SO₄, 1 mM EDTA, 10mM Tricine-
KOH, pH 7,5. Die maximale Bindung (C_O) ist auf
reines Carrierprotein umgerechnet (vgl. Text).
¹⁾ dieser Wert kann auf 6,8 μMol/g erhöht werden
(vgl. Abb.31).

ser Wert ist identisch mit Befunden von anderen Arbeits-
gruppen (75 - 77), die für ein Polypeptid mit Molekular-
gewicht 30 000 den gleichen relativen Anteil beschreiben.
Die Werte für das isolierte Protein werden auf 70 % Ge-
halt an reinem Carrier bezogen (s.o.). Auf dieser Grund-
lage können die Bindungsdaten zwischen mitochondrialem
und künstlichem System direkt miteinander verglichen wer-
den. Um weiterhin identische Bedingungen zu gewährleisten,
wurde die Bindung an Mitochondrien auch mit dem Puffer
mit hoher Ionenstärke getestet (vgl. Tab.VII), der bei
den Versuchen mit dem isolierten Protein verwendet wurde.

In Tab.VII wird die drastische Veränderung der Bin-
dungsfähigkeit nach dem Einbau in Liposomen deutlich.
Nach der Solubilisierung mit Detergens und der Isolie-
rung des Proteins sinkt die Affinität für CAT ca 20-30-
fach und die maximale Bindung wird relativ gering. Nach
dem Einbau in künstliche Phospholipidmembranen steigt
die maximale Bindung ungefähr um Faktor zwei und erreicht
etwa 1/3 der Bindung von CAT an intakte Mitochondrien

unter den gleichen Bedingungen. Die Erhöhung der Bindungsaffinität durch den Liposomeneinbau ist sehr ausgeprägt und erreicht exakt die Werte, die in Mitochondrien gemessen werden.

3.3.3. Rekonstitution der BKA-Bindung

Mit dem künstlichen System, in dem eine Rekonstitution der CAT-Bindung erreicht wurde (3.3.2.), konnte unter identischen Bedingungen kaum eine Wechselwirkung des Inhibitors BKA mit dem Carrierprotein beobachtet werden und zwar sowohl im solubilisierten als auch im inkorporierten Zustand des Proteins (Abb.25 und Tab.VIII). Die Bindung an das solubilisierete Protein ist annähernd null (in Abb. 25 durch den Ursprung dargestellt), und auch nach dem Einbau in die Phospholipidmembran konnten nur ganz geringe Mengen an das Protein gebunden werden. Aus Experimenten mit intakten Mitochondrien (78,83) ist jedoch bekannt, daß ADP die Bindung von BKA an den Adeninnucleotid-Carrier

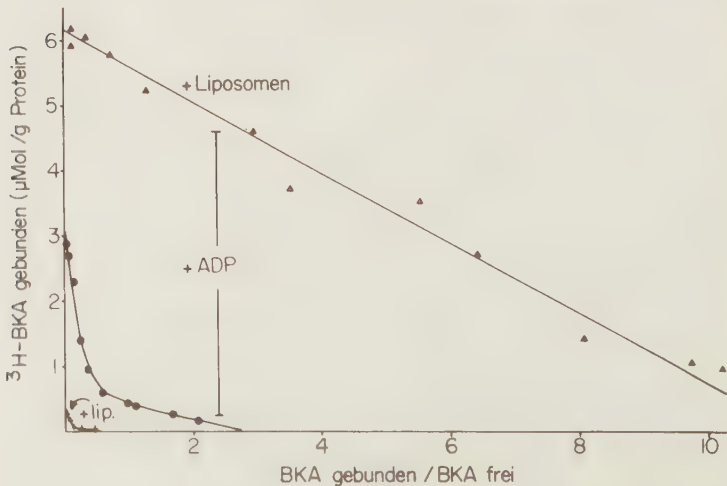


Abb.25 Bindung von $^3\text{H-BKA}$ an den Adeninnucleotid-Carrier

BKA-Bindung an	ADP (50 μ M)	Bindungsaffinität			
		hoch		niedrig	
		C_o (μ Mol/g)	K_d (μ M)	C_o (μ Mol/g)	K_d (μ M)
Rinderherzmitoch.	+	10 $\cdot$ 18 ¹⁾	0,01- ²⁾ 0,04		
-	-	0	-	0,2	2
solubil. +Lipos.	-	0,2	0,1	0,2	1,5
Carrier- protein -	+	0,7	0,08	3,75	1,5
+Lipos.	+	6,4	0,08	0	-

Tab.VIII Bindung von BKA an den Adeninnucleotid-Carrier
Erläuterungen wie in Abb.VII, alle Bindungsversuche mit dem isolierten Protein wurden in dem Puffer 2 durchgeführt.

¹⁾nach (62) ²⁾nach (84)

verstärkt (vgl. Einleitung). Dieser Effekt wird auch im rekonstituierten System beobachtet.

Gibt man ADP zum isolierten Carrierprotein, dann steigt die Fähigkeit zur Bindung von BKA, jedoch vornehmlich in Form einer unspezifischen Bindung mit niedriger Affinität. Eine Rekonstitution der spezifischen Bindung nach ADP-Zugabe wird nur im Vesikelsystem mit inkorporiertem Protein beobachtet (Abb.25). Das Ausmaß der Rekonstitution kann nur schwer mit der Bindung an Mitochondrien verglichen werden (Tab.VIII), da wegen der unspezifischen Wechselwirkung von BKA mit der Phospholipidphase der Membran (34) nur unsichere Daten über die Affinität der Bindung an Mitochondrien verfügbar sind (84). Die maximale Bindung (C_o) im rekonstituierten System erreicht ca 40-50 % der Werte, die für das isolierte BKA-Protein gefunden wurden (78), bei dem der Inhibitor vor der Solubilisierung zugegeben wird. Damit wurde durch den Einbau des isolierten Carrierproteins in die Phospholipid-Vesikel im Falle von BKA nicht nur - wie bei CAT - die Bindung

mit ursprünglicher Affinität und beträchtlichem Ausmaß wiederhergestellt, sondern auch die gleiche Abhängigkeit von Adennucleotiden rekonstituiert, wie sie in intakten Mitochondrien gefunden wird.

Die Steigerung der BKA-Bindung durch ADP wurde in Abhängigkeit von der Konzentration an Nucleotiden untersucht (Abb.26). Diese Ergebnisse sind in Abb.27 in reziproker

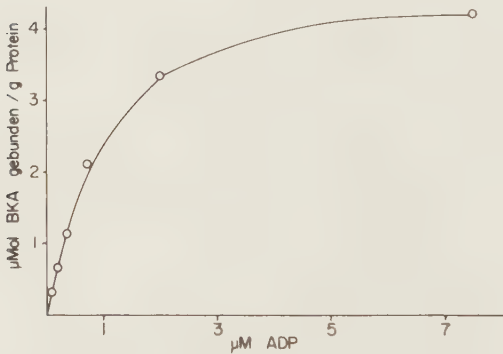


Abb.26 Einfluß von ADP auf die Bindung von BKA

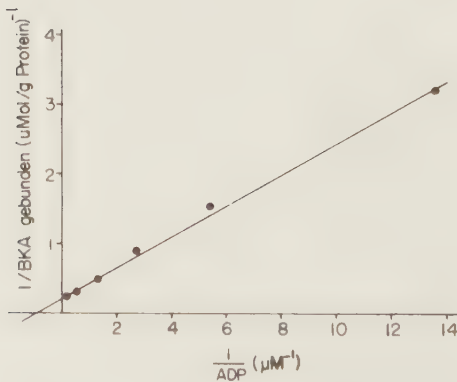


Abb.27 Einfluß von ADP auf die Bindung von BKA, reziproke Auftragung

Form aufgetragen. Die lineare Abhängigkeit bei reziproker Auftragung deutet auf einen definierten scheinbaren K_m -Wert von ADP in Bezug auf die Bildung des BKA-Protein Komplexes hin. Die Spezifität dieser Bindungserhöhung wurde mit anderen Nucleotiden ausgetestet (Tab.IX).

Nucleotid	Erhöhung der BKA-Bindung scheinb. K_m (μM)	Bindung an Rinderherzmit. K_d (μM)
ADP	2	7
ATP	3	12
ITP	20	
AMP	800	

Tab.IX Einfluß von Nucleotiden auf die Bindung von BKA

ATP stimuliert die Bindung ebenfalls, ITP schon deutlich schwächer, während AMP fast keine Wirkung mehr zeigt. Die scheinbaren K_m -Werte für ADP und ATP sind den Dissoziationskonstanten K_d von ADP und ATP für Rinderherzmitochondrien (62) bei der Bindung an das Carrierprotein sehr ähnlich. Auch die Spezifität für andere Nucleotide zeigt vergleichbare Abstufungen in intakten Mitochondrien (76) und im rekonstituierten System.

Eingebautes Carrierprotein und		Bindung von	
1.Zugabe	2.Zugabe	3H -BKA ($\mu Mol/g$)	^{14}C -ADP ($\mu Mol/g$)
^{14}C -ADP	-	--	< 0,1
3H -BKA	-	1,3	-
^{14}C -ADP + 3H -BKA	-	4,9	< 0,1
^{14}C -ADP	3H -BKA	4,9	< 0,1
3H -BKA	^{14}C -ADP	4,6	< 0,1

Tab.X Bindung von ADP an den Carrier

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu betonen, daß bei diesen Experimenten keine Bindung von ADP beobachtet werden konnte, weder bei Zugabe von ADP vor, gleichzeitig oder nach der Gabe von BKA (Tab.X).

3.3.4. Spezifische Wechselwirkung verschiedener Liganden mit dem rekonstituierten Adeninnucleotid-Carrier

Durch die gleichzeitige Zugabe beider Inhibitoren CAT und BKA zum Carrierprotein sollte man zusätzliche Aussagen über die relativen Affinitäten und andere Faktoren, die die Spezifität der Bindung bestimmen, gewinnen können. Dieser Weg wurde zuerst in Experimenten beschritten, in denen ein gebundener, radioaktiv markierter Ligand durch einen anderen unmarkierten Liganden verdrängt wird (44). Zu diesem Zweck wurde in dem hier verwendeten System entweder ^3H -CAT oder ^3H -BKA an das isolierte und an das in Phospholipidmembranen eingebaute Carrierprotein gebunden und die Wirkung verschiedener Effektoren wie CAT, BKA, ADP, ATP und ITP untersucht (Abb.28). Sowohl CAT als auch BKA wurden vollständig durch den jeweiligen homologen Liganden verdrängt. Die Nucleotide ADP, ATP und ITP allein hatten keine Wirkung. Unter dem Einfluß von BKA im Überschuß (Säule 6 in Abb.28a) nahm die Menge an gebundenem CAT um ca 30 % ab, bei gleichzeitiger Zugabe von BKA und ADP jedoch wurde CAT in viel größerem Ausmaß verdrängt. ATP hatte mit BKA zusammen eine etwas geringere Wirkung und ITP erreichte keine Verdrängung, die über den Effekt von BKA allein hinausging.

Ähnliche Ergebnisse erhält man mit gebundenem BKA (Abb.28b). Hier unterstützen ADP und ATP die Verdrängung von gebundenem BKA durch CAT. Das relativ große Ausmaß der Verdrängung von BKA durch CAT allein beruht auf der kleinen Menge an ADP, die schon im Inkubationsmedium vorhanden sein muß, da ADP zur vorhergehenden Bindung von BKA notwendig ist.

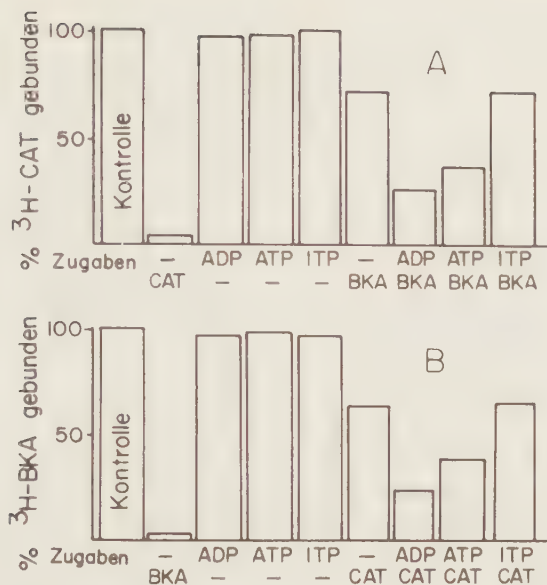


Abb. 28 Wechselwirkung von BKA und CAT mit anderen Liganden. CAT und BKA als verdrängende Liganden wurden in etwa 100fachem Überschuß (20-40 μM) zugesetzt, Nucleotide in einer Konzentration von 250 μM . Die Gleichgewichtsdialyse wurde in 0,5 M NaCl, 10 mM Tricine-KOH, pH 7,5 bei 21°C durchgeführt (5 h); beide Dialysekammern enthielten gleiche Mengen an Liposomen (unspezifische Adsorption des BKA!), eine Kammer zusätzlich das inkorporierte Carrierprotein.

Durch Membranfiltration und Gelchromatographie war es möglich, diesen Verdrängungsvorgang kinetisch aufzulösen. Es ist zu vermuten, daß der zeitliche Verlauf der Verdrängung von gebundenem CAT und BKA in der Gegenwart von ADP stark von der Inkorporation des Carrierproteins in die Phospholipidmembran abhängig ist. Zum Vergleich er-

BKA-Verdrängung von	kinet. Anteil	^3H -BKA verdrängt ($\mu\text{Mol/g}$) %		Halbwerts- zeit (min)
1 BKA-Protein Komplex	1	10,4	100	90
2 BKA-Protein +Liposomen Komplex	1	2,4	22	∞
	2	3,5	32	16
	3	5,0	46	6
3 unbeladenes +Liposomen Carrierprot. +BKA	1	1,4	20	∞
	2	2,0	30	18
	3	3,4	50	5
4 unbeladenes +Liposomen Carrierprot. (internes ADP) +BKA	1	3,0	50	∞
	2	-	-	-
	3	3,1	50	10

Tab.XI Verdrängung von gebundenem ^3H -BKA durch CAT.

^3H -BKA wird an das Carrierprotein in den angegebenen Formen gebunden. Ein Überschuß von CAT (50 μM) wird zusammen mit ADP (50 μM) zugegeben. In Experiment 4 ist zusätzlich ADP (50 μM) im Innenraum der Liposomen anwesend.

folgte daher in den nachfolgenden Versuchen die Zugabe des verdrängenden Liganden CAT entweder zum solubilisierten BKA-Protein Komplex, zum membrangebundenen BKA-Protein Komplex oder zum membrangebundenen Carrierprotein (rekonstituiertes Protein), an das nach der Inkorporation der Ligand BKA gebunden worden war (Tab.XI). In Abb.29 sind als Beispiel die Verhältnisse von Nr. 3 aus Tab.XI ausführlich dargestellt. Die Kinetik der BKA-Verdrängung (Linie $C_1 + C_2 + C_3$ in Abb.29) kann in drei verschiedene Komponenten zerlegt werden, die einfache Kinetiken zeigen: C_1 , eine Komponente, die auch nach sehr langen Inkubationszeiten nicht verdrängt werden kann (ca 20 % der maximalen Bindung) und zwei leicht verdrängbare Anteile der BKA-Bindung, C_2 (30 %) mit einer Halbwertszeit von 18 min und C_3 (50 %) mit einer Halbwertszeit von ca 5 min. Die anderen Experimente in Tab.XI wurden in gleicher Weise ausgeführt und wie in Abb.29 beschrieben analysiert.

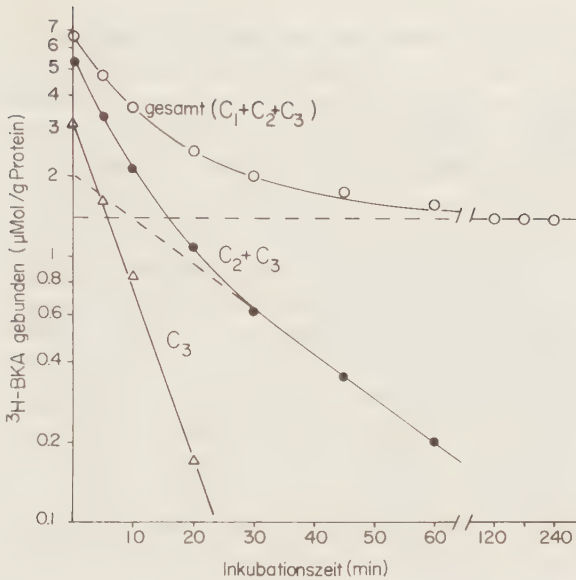


Abb. 29 Kinetik der BKA-Verdrängung durch CAT

Ein Überschuß von CAT (50 µM) wurde zum rekonstituierten Carrierprotein gegeben, an das vorher ^3H -BKA gebunden worden war. Das restliche gebundene BKA wurde nach den angegebenen Inkubationszeiten gemessen. In Kurve $C_2 + C_3$ ist der nicht-verdrängbare Anteil C_1 abgezogen. Weiteres Abziehen von Teil C_2 (entspricht dem linearen Anteil der Kurve $C_2 + C_3$) ergibt den kinetischen Anteil C_3 .

In Tab. XI ist zu sehen, daß der Großteil des an den inkorporierten Carrier gebundenen BKA (C_1 und C_2) mit identischer Kinetik verdrängt wird, gleichgültig, ob BKA an den Carrier vor der Solubilisierung oder erst nach der Inkorporation gebunden wurde.

Um sicher zu gehen, daß man in diesen Experimenten tatsächlich einen Austausch der Inhibitoren beobachtet und nicht etwa nur eine Ablösung des jeweiligen Liganden mit

nachfolgender Inaktivierung des Proteins, wurden die Versuche von Abb.28 und Tab.XI umgekehrt, sodaß jetzt ^3H -CAT zum Protein gegeben wurde, an das vorher unmarkiertes BKA gebunden worden war. Tab.XII zeigt, daß CAT nun mit nahezu der gleichen Halbwertszeit (16 min) bindet, mit der umgekehrt BKA verdrängt wurde (Nr. 4 in Tab.XI, 10 min).

Bindung von ^3H -CAT an		ADP extern (μM)	CAT gebunden ($\mu\text{Mol/g}$)	Halbwerts- zeit
BKA-Protein Komplex	+Lipos.	0	5,0	5 h
		100	5,5	18 min
unbelad. Carrier- protein	+Lipos.	1-2 ¹⁾	3,2	5 h
	(intern	9	2,9	2,5 h
	ADP)	25	3,3	40 min
	+BKA	90	2,9	22 min
		100	3,3	16 min

Tab.XII Bindung von ^3H -CAT an das Carrierprotein nach der Verdrängung von gebundenem BKA

^3H -CAT wurde in einer Konzentration von 20 μM zugegeben. Alle anderen Erklärungen wie bei Tab.XI.

¹⁾ Diese geringe Konzentration von ADP war notwendig, um BKA vor der Verdrängung durch CAT an das Carrierprotein zu binden.

Das bestätigt die Gleichartigkeit dieser zwei Vorgänge. Das niedrigere Ausmaß der Bindung des verdrängenden Liganden im Vergleich zur ursprünglichen Bindung ist auf die bekannte Instabilität des Proteins ohne gebundenen Inhibitor, besonders in Gegenwart von ADP, zurückzuführen.

Im freien, solubilisierten BKA-Protein Komplex ist die Verdrängungskinetik vermutlich wegen des behinderten Zugangs für CAT und BKA in der Detergens/Protein-Micelle sehr langsam, jedoch vermag CAT hier das gesamte gebundene BKA zu verdrängen. Nach dem Einbau in die Phospho-

lipidmembran kann das gebundene BKA in drei kinetisch unterscheidbare Komponenten aufgeteilt werden. Zusätzliche Anwesenheit von ADP im internen Volumen der Vesikel erhöht die nicht verdrängbare Komponente (C_1) auf 50 %, während der ablösbare Anteil einer einfachen Kinetik erster Ordnung folgt und - der Halbwertszeit nach - der Komponente C_3 aus Abb.29 entspricht. Diese Ergebnisse können zusammen mit Untersuchungen zur Proteinmobilität (Abschnitt 3.4.1.) dahingehend interpretiert werden, daß sich die Bindungsstellen ursprünglich auf beiden Seiten der Membran befinden. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von hohen CAT- und ADP-Konzentrationen wird an den außen befindlichen Bindungsstellen sofort BKA gegen CAT ausgetauscht (C_3), während die innen liegenden Bindungsstellen z.T. nach außen wandern können (C_2) oder nach innen gerichtet verharren (C_1). In Gegenwart von internem ADP jedoch ist die BKA-Bindung innen so fest, daß sie durch CAT nicht nach außen gezogen werden kann.

In die gleiche Richtung weisen auch Versuche, in denen CAT und BKA gleichzeitig zu Phospholipid-Vesikeln mit inkorporiertem Carrierprotein gegeben werden. Wie in Tab.VII und Tab.VIII gezeigt, bindet ungefähr doppelt so viel BKA wie CAT (niedere Konzentration) an das rekonstituierte Carrierprotein (Abb.30, Säule a und b, g und h). Ebenso ist die Bindung von BKA an das Protein von der Anwesenheit von ADP abhängig (Säule c,e und i in Abb.30), obwohl bei den sehr lange dauernden Gleichgewichtsdialysen der Unterschied nicht so deutlich ist. Entsprechend der oben ausgeführten Hypothese kann CAT in den verwendeten Konzentrationen nur die Hälfte der Bindungsstellen besetzen, während BKA den Rest mehr oder weniger vollständig auffüllt. Unter optimalen Bedingungen, d.h. erstens hohe Konzentrationen an CAT im äußeren Volumen, damit keine Konkurrenz durch das anwesende BKA besteht und zweitens extern und intern Anwesenheit von ADP, da-

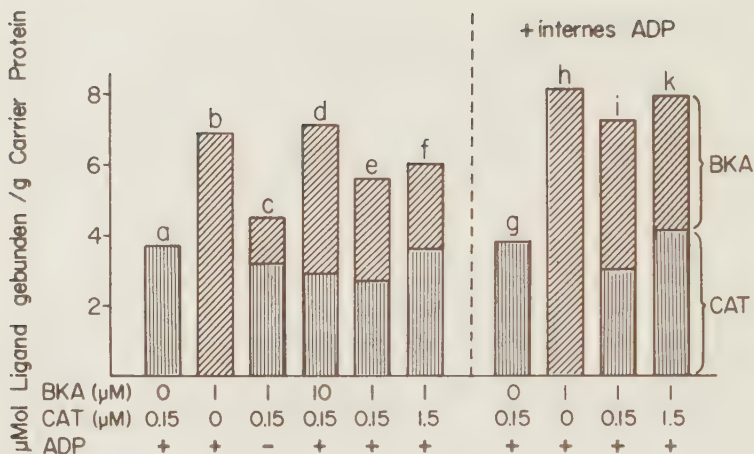


Abb.30 Gleichzeitige Bindung von CAT und BKA

Die Bedingungen sind mit den Verhältnissen in Abb. 28 identisch. Das Verhältnis des zugesetzten BKA (1 µM) zum zugesetzten CAT (0,15 µM) entspricht dem Verhältnis der Dissoziationskonstanten und gewährleistet damit echte Konkurrenzbedingungen. Externes (100 µM) und internes (80 µM) ADP wurde zugegeben, wo es in der Abb. angezeigt ist.

mit CAT die Bindungsstellen nicht nach außen ziehen kann, verteilen sich die beiden Inhibitoren tatsächlich im Verhältnis 1 : 1 auf die verfügbaren Bindungsstellen (Säule k in Abb.30).

3.4. Rekonstitution der Transportaktivität des Adeninnucleotid-Carriers in künstlichen Phospholipidmembranen

3.4.1. Mobilität des Carriers nach der Inkorporation in Phospholipidmembranen (90)

Im Abschnitt 3.3.4. wurden Experimente zur Kinetik der Verdrängung von gebundenem BKA durch einen Überschuß von CAT beschrieben, die darauf hindeuteten, daß die Bindungsstelle(n) des Carriers nach der Inkorporation zur Hälfte auf die Außen- und zur Hälfte auf die Innenseite der Membran gerichtet sind. Wenn der Carrier, oder zumindest die Bindungsstelle des Carriers für Inhibitoren bzw. für Nucleotide, wie in der Mitochondrienmembran mobil ist, müßte sich dies mit Hilfe der beiden Inhibitoren nachweisen und messen lassen.

Ausgangspunkt ist der in Tab.VII und VIII sichtbare Unterschied in der maximalen Bindung von CAT (ca 3,5 $\mu\text{Mol/g}$) und BKA (ca 6,4 $\mu\text{Mol/g}$). Wie bereits erwähnt, kann BKA bei dem verwendeten pH frei durch die Phospholipidmembran permeieren, während CAT die Membran nicht passieren kann. Die Differenz der Maximalbindung wäre folglich dadurch zu erklären, daß CAT nur die nach außen gerichteten Bindungsstellen erreicht, während BKA alle Bindungsstellen besetzen kann. Sind diese Bindungsstellen darüberhinaus beweglich, so müßte sich durch geeignete Manipulationen die Population der Bindungsstellen, die auf eine Seite gerichtet sind, auf Kosten der anderen Population vermehren lassen.

Als grundlegendes Experiment wurde hierzu in Bindungsversuchen mit CAT bedeutend höhere Inhibitorkonzentrationen als in Abschnitt 3.3.2. (50 μM statt 1 μM) sowie längere Inkubationszeiten angewandt. Damit konnte die CAT-Bindung deutlich erhöht werden und zwar auf Werte, die der maximalen Bindung von BKA sehr ähnlich sind (Abb.31). Zusätzlich wird jetzt im Unterschied zur einfachen CAT-Bindung im Abschnitt 3.3.2. eine Abhängigkeit von ADP

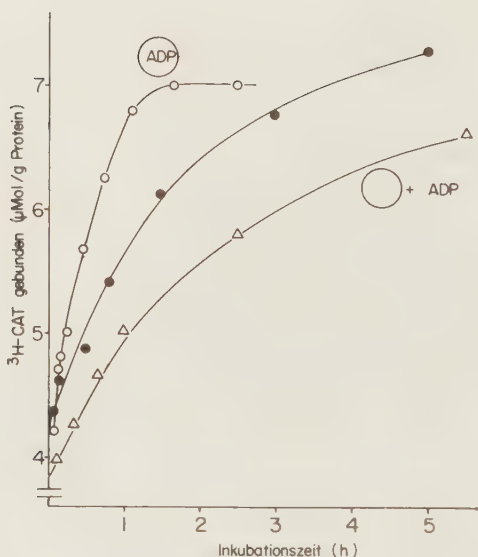


Abb. 31 Bindung von ^3H -CAT bei hohen CAT-Konzentrationen. In jedem Experiment wurde $50\text{ }\mu\text{M}$ ^3H -CAT zugegeben, zusätzlich war - wo angegeben - $80\text{ }\mu\text{M}$ ADP im inneren oder im äußeren Volumen anwesend. Durch halb-logarithmische Auftragung (entsprechend Abb. 29) wurden die Halbwertszeiten wie folgt bestimmt: 85 min (ohne ADP), 65 min (externes ADP) und 18 min (internes ADP).

sichtbar: Ohne ADP verläuft die Erhöhung der CAT-Bindung sehr langsam (Halbwertszeit: 85 min); durch Zugabe von ADP außerhalb der Liposomen wird der Vorgang nur geringfügig beeinflusst. ADP im Innern der Liposomen jedoch beschleunigt den Prozeß deutlich (Halbwertszeit: 18 min). In allen diesen Versuchen blieb die grundlegende Bindung von ca $3,5\text{ }\mu\text{Mol CAT/g Protein}$ unbeeinflusst; diese Art von Bindung verläuft zu schnell, um mit den hier verwendeten Methoden kinetisch aufgelöst zu werden.

Um die Hypothese, daß die Beobachtungen mit einer Verschiebung der Bindungsstellen von innen nach außen zu erklären ist, zu bestätigen, wurde der umgekehrte Weg beschritten: die Liposomen wurden mit hohen internen Konzentrationen an CAT beladen. Nach Abtrennung des äußeren (unmarkierten) CAT und Zugabe des Carrierproteins, wurde von außen radioaktives CAT zugegeben, um damit die verfügbaren Bindungsstellen auf der Vesikelaußenseite erfassen zu können. Abb.32 zeigt, daß nach dem Mischen des Carrierproteins mit den Liposomen und der darauf folgen-

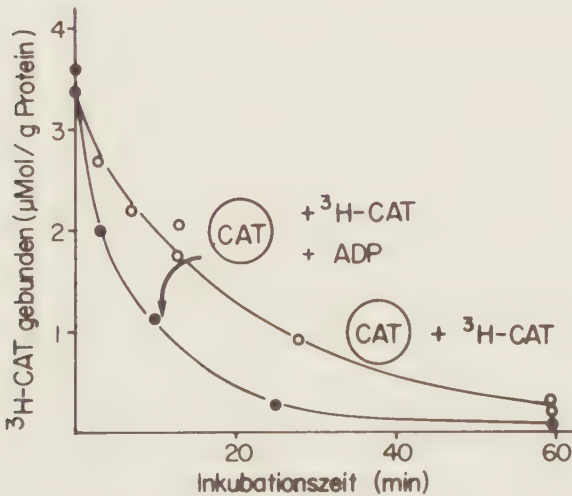


Abb.32 Einfluß von internem CAT auf die Bindung von $^3\text{H-CAT}$ Liposomen mit internem CAT ($70 \mu\text{M}$) wurden zum Zeitpunkt 0 mit dem Carrierprotein gemischt. Nach den angegebenen Zeiten wurde $^3\text{H-CAT}$ ($1 \mu\text{M}$) und ADP ($50 \mu\text{M}$) von außen zugegeben. Nach 2 min wurde durch Membranfiltration die Bindung von $^3\text{H-CAT}$ bestimmt. Die durch halblogarithmische Auftragung entsprechend Abb.29 bestimmten Halbwertszeiten betrugen 16 min (ohne ADP) und 5 min (mit ADP).

den Inkorporation die anfänglich rekonstituierte Bindungsaktivität von etwa $3,5 \mu\text{Mol/g Protein}$ im Laufe der Inkubationszeit auf weniger als ein Zehntel absinkt. ADP, jetzt allerdings im äußeren Volumen, bewirkt eine deutliche Beschleunigung des Vorgangs.

Der mögliche Einwand, daß die Ergebnisse von Abb.32 lediglich mit einer Isotopenverdünnung durch die Permeation des inneren, unmarkierten CAT in den Außenraum zu erklären sind, kann durch zwei Argumente entkräftet werden: Erstens würde, bedingt durch das geringe innere Volumen der Vesikel, selbst bei völliger Äquilibrierung des internen und externen CAT die spezifische Aktivität des von außen zugegebenen CAT nur auf ca 50 % des ursprünglichen Wertes

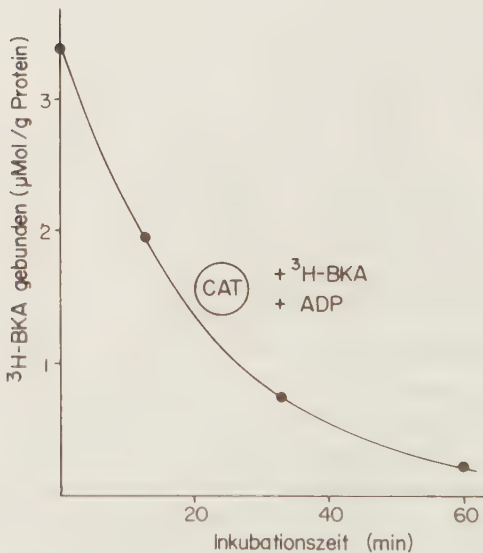


Abb.33 Einfluß von internem CAT auf die Bindung von $^3\text{H-BKA}$. Alle Bedingungen wie bei Abb.32, $^3\text{H-CAT}$ wurde durch $^3\text{H-BKA}$ ersetzt.

sinken. Zweitens zeigen Kontrollexperimente mit markiertem internem CAT in der gleichen Konzentration, daß während der angewandten Inkubationszeiten weniger als 1 - 2 % des im Innenraum der Vesikel befindlichen CAT nach der Entfernung des äußeren CAT den Außenraum erreicht. Der oben beschriebene Versuch, interpretiert als Wanderung der Bindungsstellen nach innen, steht somit in völligem Einklang zu dem in Abb.31 beschriebenen Experiment, das durch Wanderung der Bindungsstellen nach außen erklärt werden konnte.

Als weitere Bestätigung kann die Wiederholung des in Abb.32 dargestellten Versuches mit Zugabe von BKA statt CAT von außen angesehen werden (Abb.33). Die Fähigkeit, ^3H -BKA an der Außenseite zu binden (innen ist wegen der hohen CAT-Konzentrationen keine Bindung von BKA möglich!), nimmt unter dem Einfluß der hohen internen Konzentration von CAT in ähnlicher Weise wie die Bindung von ^3H -CAT in Abb.32 ab. Die berechnete Halbwertszeit dieses Vorgangs entspricht dem Wert des entsprechenden Versuchs mit ^3H -CAT.

Beim Vergleich dieser Beobachtungen mit der natürlichen Carrierfunktion in Mitochondrien aus Rinderherzen müssen die drastischen Aktivitätsunterschiede beachtet werden: Der schnellste Vorgang der Carriermobilität im künstlichen System, die durch ADP katalysierte Zunahme der CAT-Bindung an der Membranaußenseite, hat eine Halbwertszeit von ca 5 min, während diese Zeit in Mitochondrien kleiner als 0,05 sec ist, wie aus der Wechselzahl berechnet werden kann (34).

3.4.2. Aktivität des Carriers nach dem Einbau in die Phospholipidmembran

3.4.2.1. Aktivität des Carriers in Liposomen

Wie in Abschnitt 3.3. beschrieben, treten viele Eigenschaften des Adennucleotid-Carriers aus der inneren Mitochondrienmembran, die durch die Solubilisierung und Iso-

lierung verloren gegangen sind, nach dem Einbau in künstliche Phospholipidmembranen wieder auf: Die Affinität zu den Inhibitoren CAT und BKA, die Sensitivität der BKA-Bindung für ADP, die Spezifität und Affinität der Wirkung von Nucleotiden auf die Bindung von BKA und schließlich eine, wenn auch sehr geringe, Mobilität des Carrierproteins in der Membran. Die eigentliche Funktion des Carriers in der Mitochondrienmembran jedoch, der Transport von Adeninnucleotiden, konnte mit diesem System nicht beobachtet werden. Zwar wurden alle Bedingungen in ausreichender Weise variiert (Art der Phospholipide, Ladung der Phospholipide, Sättigungsgrad der Fettsäuren, Anwesenheit von ein- und zweiwertigen Ionen, Verhältnis von Phospholipid zu Detergens in der künstlichen Membran, Verhältnis von Protein zu Phospholipid nach dem Einbau, pH- oder Ionengradient über die Membran, Nucleotidgradient über die Membran usw.), es konnten jedoch nie Werte gemessen werden, die in signifikantem Ausmaß über die Menge an gebundenen Nucleotiden hinausgingen.

Da das Protein offensichtlich in nativem Zustand vorliegt (Experimente des Abschnitts 3.3.) und auch mit ausführlichen Versuchen, in denen zum isolierten Carrier verschiedene Mengen an Gesamtsolubilisat von Mitochondrien zugesetzt wurde, keine Transportaktivität rekonstituiert werden konnte, erschienen Erklärungen unwahrscheinlich, die die fehlende Austauschaktivität auf eine Denaturierung des Proteins oder auf ein Fehlen eines essentiellen Proteinfaktors zurückführten. Die weiteren Versuche konzentrierten sich deshalb auf eine Änderung und Verbesserung des Phospholipidsystems.

3.4.2.2. Aktivität des Carriers in großen Vesikeln

Die bisher verwandten kleinen Liposomen, die durch Ultraschalleinwirkung erzeugt wurden, sind Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 200 - 250 Å. Die Phospholipid-

membran, die selbst schon eine Dicke von ungefähr 50 Å besitzt, ist dabei so stark gekrümmt, daß das Mengenverhältnis zwischen den Phospholipidmolekülen der äußeren Hälfte der Doppelschicht und denen der inneren Hälfte den Wert von ca 2 : 1 erreicht (45). Es wäre wünschenswert, größere Phospholipidvesikel herzustellen, die im Krümmungsradius der Membran mehr den Verhältnissen in Mitochondrien entsprechen als die durch Ultraschall erzeugten Liposomen.

Dazu wurde ein Verfahren angewandt, das vor kurzem von Deamer und Bangham (61) beschrieben wurde. Dabei werden durch Verdampfen einer ätherischen Lösung des Phospholipids in eine 60°C heiße Pufferlösung Phospholipid-Vesikel erzeugt, die einen mittleren Durchmesser von 1000 - 1500 Å aufweisen. Die Charakteristika dieser Vesikel sind in Teil 2. beschrieben. Die Transportversuche wurden wie im Abschnitt 2.6. erläutert durchgeführt, nur wurde wegen der größeren osmotischen Labilität dieser Vesikel auf eine Chromatographie über DOWEX verzichtet, sondern die äußeren Nucleotide mit Hilfe von Sephadex G-75 abgetrennt.

Die in Tab.XIII zusammengefaßten Versuchsergebnisse zeigen folgende Charakteristika:

- 1) Für den Transport ist die Anwesenheit von Nucleotiden im Innenraum der Vesikel notwendig, d.h. es findet ein Austausch wie in Mitochondrien statt.
- 2) Der Transport ist spezifisch für ADP und ATP, mit AMP sind die Raten äußerst gering.
- 3) Die Transportrate von 5,6 $\mu\text{Mol/g} \times \text{min}$ entspricht nur etwa 0,07 % der mitochondrialen Aktivität (zur Berechnung vgl. Abschnitt 3.4.3.2.)

Im Unterschied zu den kleinen, durch Ultraschall erzeugten Liposomen ist zwar ein Transportvorgang zu beobachten, der als Austauschvorgang, spezifisch für ADP und ATP abläuft, im Vergleich zu Mitochondrien ist er jedoch von verschwindend geringer Aktivität.

Nucleotid		n	Transportierte Nucleotide	
intern	extern		(μMol/g)	
			nach 1 min	nach 5 min
-	ADP	2		2,7
AMP	AMP	2		1,8
AMP	ADP	2		3,2
ADP	AMP	2		3,6
ADP	ADP	14	5,6 ⁺ ₋ 2,9	8,0 ⁺ ₋ 2,7
ADP	ATP	6		11,2 ⁺ ₋ 2,5
ATP	AMP	2		3,7
ATP	ADP	2		7,6
ATP	ATP	2		8,6

Tab.XIII Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports in großen Vesikeln
Die Nullwerte (Bindung und Säulen-Nullwert) betrugen ca 4 - 12 $\mu\text{Mol/g}$. Als Phospholipid wurde eine Mischung aus PC/DPG = 25/1 verwendet (vgl. dazu Abb.4).

3.4.3. Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports im künstlichen Vesikelsystem (85)

3.4.3.1. Rekonstitution der Transportaktivität

Mit den kleinen Liposomen wurde somit nur geringe Carriermobilität (Abschnitt 3.4.1.) und kein Transport (Abschnitt 3.4.2.1.) von Adeninnucleotiden festgestellt und auch mit großen Phospholipid-Vesikeln mit geringer Membrankrümmung wurden nur äußerst geringe Transportraten erreicht (Abschnitt 3.4.2.2.). Andererseits konnte eine völlige Denaturierung des Proteins ausgeschlossen werden (Abschnitt 3.4.2.1.). Zur Verbesserung der Bedingungen für die Rekonstitution kam daher noch eine Behand-

lung des künstlichen Systems nach dem Proteineinbau in Frage.

Um möglichst optimale Bedingungen zu schaffen, wurden dazu Liposomen verwendet, die durch kurze Ultraschalleinwirkung (5 - 10 min reine Beschallungszeit) präpariert worden waren und damit größere Innenvolumina und eine kleinere Membrankrümmung besaßen. Nach der Inkorporation des isolierten Carrierproteins in diese Vesikel und nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde der Ansatz einer weiteren Beschallung ausgesetzt. Für die Nachbeschallung mußte die Schallenergie im Vergleich zur Liposomenpräparation erniedrigt werden.

Mit dieser Methode schließlich war eine erfolgreiche Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports möglich. In Abb.34 ist die rekonstituierte Austauschaktivität auf

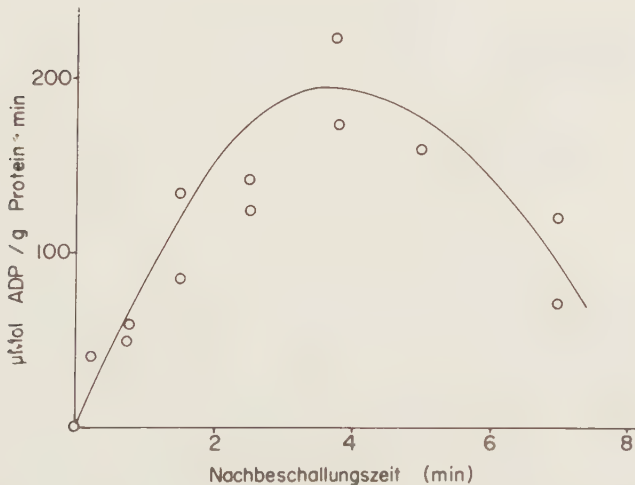


Abb.34 Einfluß der Nachbeschallung auf die Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports

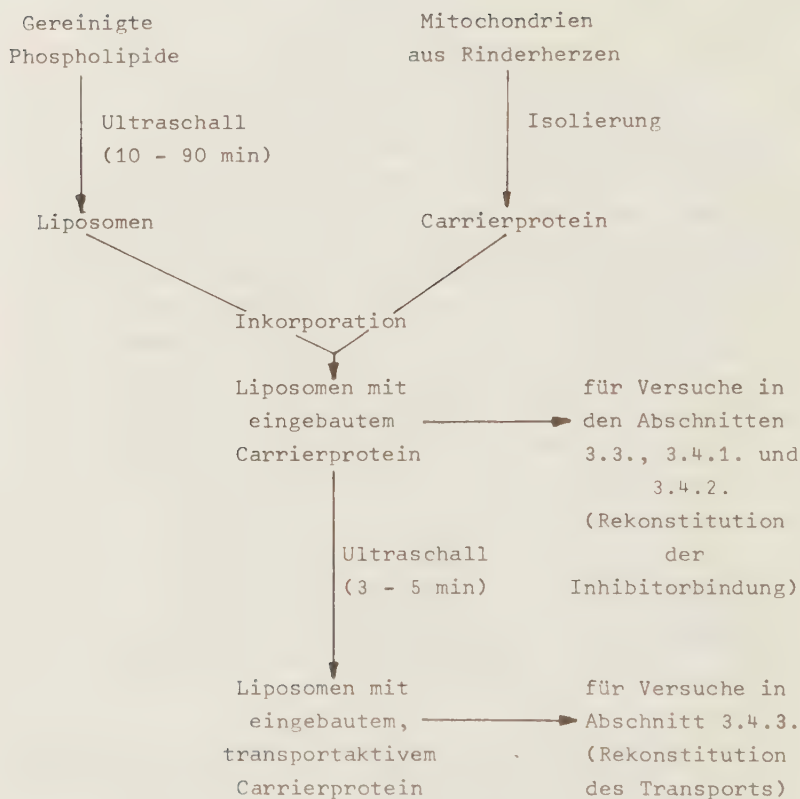


Abb.35 Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports

die Zeit der Nachbeschallung bezogen. Dabei ist ein klares Optimum des Rekonstitutionseffektes zu erkennen. Leider ist die in Abb.34 beschriebene Abhängigkeit von Versuch zu Versuch sehr variabel, da die Lage des Optimums stark von der abgestrahlten Schallenergie (abhängig von der Stellung der Titanspitze im Beschallungsgefäß und vom zu beschallenden Volumen) und von der Konzentration an Phospholipiden abhängt. Zusammen mit dem wechselnden Ausmaß der Proteindenaturierung (Abschnitt 3.2.2.) ist dies eine maßgebliche Ursache für die immer wieder auf-

tretende Variabilität im Ausmaß der Rekonstitution.

Eine Übersicht über den Verlauf der für die Wiederherstellung der Inhibitorbindung und des Adeninnucleotid-Transports angewendeten Methoden gibt Abb.35.

3.4.3.2. Charakterisierung des rekonstituierten Adeninnucleotid-Transports

Mit der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Methode war es möglich, die Transportfunktion des isolierten Adeninnucleotid-Carriers aus der inneren Mitochondrienmembran in künstlichen Phospholipid-Vesikeln in beträchtlichem Ausmaß wiederherzustellen. Im folgenden soll der rekonstituierte Transport charakterisiert und mit der Funktion des Carriers in Mitochondrien verglichen werden.

3.4.3.2.1. Kinetik des Austausches

Der zeitliche Verlauf des Nucleotid-Austausches (Abb. 36a) kann als Kinetik erster Ordnung beschrieben werden, wenn der Austausch auf den maximal austauschbaren Pool bezogen wird, wie es in Abb. 36b geschehen ist. Die Berechnung (33) geht von einer Reaktion erster Ordnung aus:

$$v = - \frac{dA}{dt} = -k \cdot A$$

Über eine Integration vom Reaktionsbeginn (Konzentration A_0) bis zur Zeit t (Konzentration A_t) ergibt sich:

$$- \int_{A_0}^{A_t} \frac{dA}{A} = k \int_0^t dt$$

und
$$\ln \frac{A_0}{A_0 - A_t} = k \cdot t$$

(Eine Korrektur für die Isotopenverdünnung durch den endogenen Pool an Adeninnucleotiden, wie in (33) durchgeführt, ist in diesem Fall nicht notwendig, da die

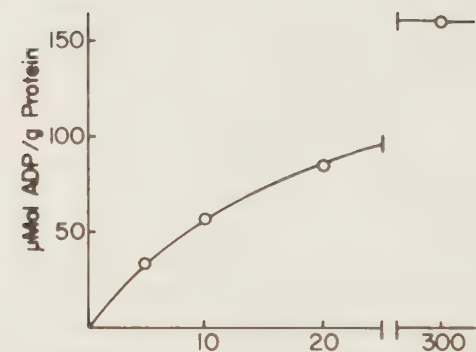


Abb. 36a Kinetik des Adeninnucleotid-Austauschs

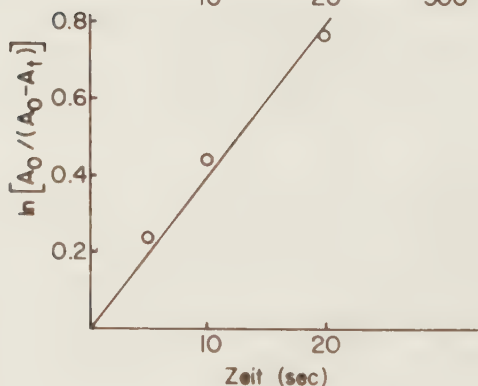


Abb. 36b Kinetik des Adeninnucleotid-Austauschs (logarithmische Auftragung)

maximal austauschbare Menge an Adeninnucleotiden im Vergleich zu der Menge an zugegebenen radioaktiven Nucleotiden sehr gering ist.) Aus der Steigung in der logarithmischen Auftragung (Abb. 36b) kann somit die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet werden.

In anderen Experimenten war allerdings oft eine Abweichung von einer Kinetik erster Ordnung festzustellen, der Austausch zeigte dann etwa einen Verlauf wie er in Abb. 37 dargestellt ist; in diesen Fällen wurde eine aus den Werten bei 0, 5 und 10 sec gewonnene Anfangsgeschwindigkeit verwendet. Die Abweichungen rühren wahrscheinlich

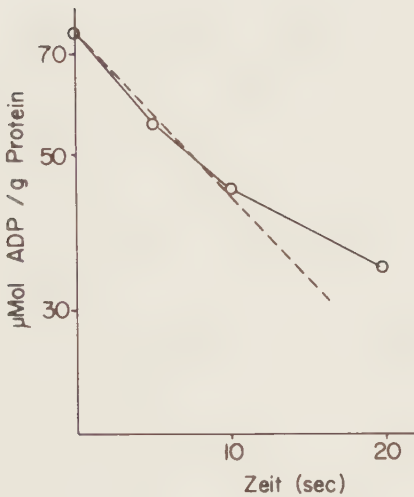


Abb.37 Kinetik des Adeninnucleotid-Austauschs
Um die Abweichung von der Linearität (Kinetik erster Ordnung) zu verdeutlichen, wurde der Austausch hier entsprechend

$$- \log (A_o - A_t) = \left(\frac{\log 2}{t \cdot 1/2} \cdot A_o \right) t$$

aufgetragen (vgl. Text).

von der in 3.4.3.1. beschriebenen Inhomogenität der Vesikel und der daraus sich ableitenden Inhomogenität des Austauschpools her. In allen späteren Angaben zur Reaktionsgeschwindigkeit wurden die entsprechend Abb.36b und Abb.37 gewonnen Werte verwendet.

Ein anderer Wert, der in den folgenden Untersuchungen zur Charakterisierung des Transports verwendet wird, ist der Maximalaustausch nach entsprechend langen Inkubationszeiten (5 - 10 min bei 21°C). Es erscheint selbstverständlich, daß diese beiden kinetischen Parameter, Reaktionsgeschwindigkeit und Maximalaustausch, hier streng auseinander-

andergehalten werden; in der Literatur jedoch wurde die Transportaktivität in natürlichen und in rekonstituierten Systemen oft irrtümlicherweise auf einen einzigen gemessenen Wert bezogen und daraus errechnet (vgl. dazu 26 - 28).

3.4.3.2.2. Abhängigkeit des Austausches vom Mengenverhältnis von Protein, Detergens und Phospholipid zueinander

Die erste Frage, die in rekonstituierten Systemen geklärt werden muß, ist die Abhängigkeit der Aktivität von der Menge an Protein, die zu einer konstanten Menge von

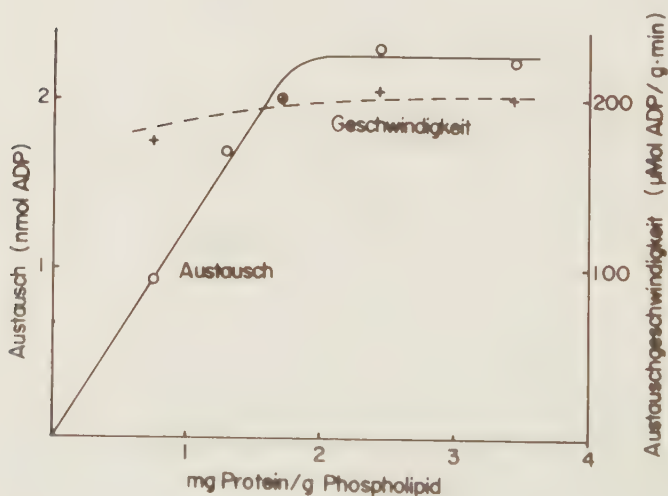


Abb.38 Abhängigkeit des Austausches vom Verhältnis Protein/Phospholipid

Der Austausch (ATP intern, ADP extern) wurde bei 21°C, 1 mM MgCl₂ mit Liposomen aus PC/DPG = 99/1 gemessen. Die Konzentration des Detergens im rekonstituierten System wurde durch Zugabe von LAPAO bei den niederen Proteinwerten konstant gehalten.

Phospholipid-Vesikeln zugegeben wird. Da zusammen mit dem Protein immer auch Detergens inkorporiert wird, das einen Einfluß auf die Aktivität des Carriers hat (vgl. Abb.39), wurde in diesem Versuch bei den niederen Proteinkonzentrationen so viel LAPAO zugesetzt, daß die Detergenskonzentration über den ganzen Bereich konstant war. Die Ergebnisse, die in Abb.38 aufgezeichnet sind, zeigen, daß die absolute Menge an ausgetauschtem Nucleotid von der Menge an inkorporiertem Protein linear abhängig ist, bis sie einen Maximalwert erreicht. Über den ganzen Bereich jedoch, auch im Gebiet der Sättigung, bleibt die Reaktionsgeschwindigkeit als Indikator für die Qualität des Transports relativ konstant.

Das Detergens LAPAO, das notwendigerweise zusammen mit dem Protein zugegeben wird, übt tatsächlich einen hemmenden Einfluß auf die Carrieraktivität aus, wie Abb.39 zeigt.

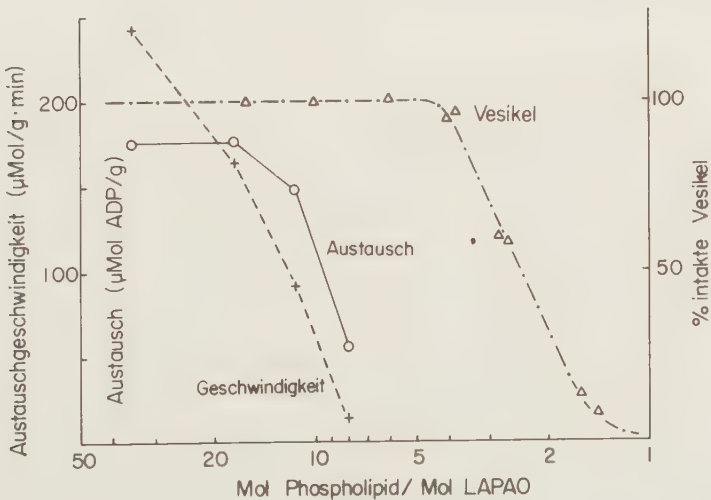


Abb.39 Abhängigkeit des Austausches vom Verhältnis Phospholipid/Detergens
Alle Bedingungen wie bei Abb.38 (0,8 mg Protein/g Phospholipid)

In diesen Versuchen wurde anders als in Abb.38 beschrieben die Menge des Detergens variiert, wobei die Mengen an Protein und Phospholipid konstant blieben. Die Membranen der Phospholipid-Vesikel brechen erst bei einem molaren Verhältnis von Phospholipid/LAPAO = 5 zusammen. (vgl. Abschnitt 3.3.1.). Die spezifische Aktivität des rekonstituierten Carrierproteins (Reaktionsgeschwindigkeit) wird jedoch schon bei viel geringeren Detergenismengen beeinträchtigt und ist bereits vollständig gehemmt bevor die Liposomen durch das Detergens sichtbar geschädigt werden. Der Maximalaustausch ist etwas weniger empfindlich.

Um in Transportversuchen verschiedene Bedingungen miteinander vergleichen zu können, ist es also wichtig, sowohl beim Verhältnis von Protein zu Phospholipid (Abb.38) als auch beim Verhältnis von Detergens zu Phospholipid (Abb.39) optimale Bedingungen zu wählen.

3.4.3.2.3. Spezifität für Phospholipide

Sowohl der Maximalaustausch als auch die Austauschgeschwindigkeit sind von der Art der Phospholipide abhängig (Tab. XIV). Das hauptsächlich zur Reconstitution verwendete Phospholipid war gereinigtes Eigelb-Lecithin, das allein schon beträchtliche Aktivität des Carriers ermöglicht. In Liposomen aus hochgereinigtem Lecithin zeigte das Carrierprotein jedoch nur geringe Aktivität. Durch Zugabe von negativ geladenen Phospholipiden (PA, DPG, auch MPL) erhielt man eine deutliche Stimulierung. Als günstigste Phospholipidumgebung für das rekonstituierte Carrierprotein erwiesen sich Mischungen aus Lecithin und mitochondrialem Phospholipid. Reines mitochondriales Phospholipid ergab Liposomen mit äußerst geringem Innenvolumen, die für die Austauschversuche nicht geeignet waren.

Phospholipid- Zusammensetzung der Liposomen	Austausch ($\mu\text{Mol ADP/g}$)	Austausch- geschwindigkeit ($\mu\text{Mol ADP/g}\cdot\text{min}$)
PC	44	82
DPG / PC = 1 / 99	106	258
DPG / PC = 1 / 19	134	330
PA / PC = 1 / 99	96	167
MPL / PC = 1 / 13	188	492
MPL / PC = 1 / 4	91	508
Eigelb-PL	126	285

Tab.XIV Abhängigkeit des rekonstituierten Adeninnucleotid-Transports von der Art der verwendeten Phospholipide

Die angegebenen Phospholipidverhältnisse sind Gewichtsverhältnisse. Der Transport wurde bei 21°C , 1 mM MgCl_2 und internem ADP/externem ATP gemessen.

3.4.3.2.4. Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen

Zweiwertige Ionen sind zum Erreichen optimaler Transportaktivitäten im rekonstituierten System notwendig. Wie Tab.XV zeigt, ist Mg^{++} am wirksamsten, jedoch sind auch Ca^{++} und Mn^{++} effektiv. Mögliche Wirkungen des Anions Cl^- wurden durch Parallelversuche mit MgSO_4 ausgeschlossen. Die Kombination von Mg^{++} und Mn^{++} steigert die Aktivität nicht über den Wert von Mg^{++} allein hinaus; dies steht im Widerspruch zu Befunden von Shertzer und Racker (27). Die geringe Spezifität der Ionenwirkung weist darauf hin, daß die Kationen nicht mit dem Nucleotid sondern eher mit den negativ geladenen Phospholipiden in Wechselwirkung treten. Weitere Unterstützung erhält diese Hypothese durch Untersuchungen mit reinem Lecithin (Tab.XV), bei dem zugesetztes Mg^{++} keinerlei Stimulierung der Carrieraktivität

Zugesetzte Ionen	Phospholipid-Zusammensetzung der Liposomen	Austausch ($\mu\text{Mol/g}$)	Austauschgeschwind. ($\mu\text{Mol/g}\cdot\text{min}$)
EDTA 1,0 mM	PC/DPG = 99/1	33	78
MgCl ₂ 0,1 mM	"	41	124
MgCl ₂ 0,5 mM	"	71	216
MgCl ₂ 1,0 mM	"	102	259
MnCl ₂ 1,0 mM	"	79	165
CaCl ₂ 1,0 mM	"	69	212
MgCl ₂ 0,5 mM + MnCl ₂ 0,5 mM	"	105	230
MgSO ₄ 1,0 mM	"	97	244
EDTA 1,0 mM	PC	37	80
MgCl ₂ 1,0 mM	"	44	82
EDTA 1,0 mM	PC/PA = 99/1	57	83
MgCl ₂ 1,0 mM	"	88	158

Tab.XV Abhängigkeit des rekonstituierten Adeninnucleotid-Transports von zweiwertigen Kationen
Alle Bedingungen wie bei Tab.XIV.

bewirkt, während schon ein Zusatz von 1 % Phosphatidsäure (negativ geladen, ohne "head group - Spezifität") den Stimulierungseffekt des Mg⁺⁺ zum Vorschein bringt.

3.4.3.2.5. Substratspezifität

Die hohe Spezifität des Nucleotidtransports für ADP und ATP in Mitochondrien war von Anfang an ein wichtiges Argument für den Nachweis und die Charakterisierung des Carriers. Auch im rekonstituierten System findet man eine hohe Spezifität für ADP und ATP (Tab.XVI) und zwar sowohl für die intern vorhandenen als auch für die extern

angebotenen Nucleotide.

Ohne ADP oder ATP im Innern der Liposomen wurde kein Transport beobachtet, es liegt also wie in Mitochondrien ein Austauschvorgang vor.

Internes Nucleotid	Externes Nucleotid (250 μ M)	Austausch (μ Mol/g)
-	ATP oder ADP	< 5
AMP (10 mM)	AMP	< 5
"	ADP oder ATP	< 5
ADP (10 mM)	ATP	135
"	ADP	118
"	AMP	< 5
"	GDP	< 10
ATP (20 mM)	ATP	250
"	ADP	173
"	AMP	< 5
"	GDP	< 10

Tab.XVI Nucleotidspezifität des rekonstituierten Adeninnucleotid-Transports

Der Austausch wurde bei 21°C, 1 mM MgCl₂ mit Liposomen bestehend aus PC/MPL = 4/1 gemessen.

3.4.3.2.6. Wirkung der Inhibitoren CAT und BKA

Eine weitere Grundlage, das System des Adeninnucleotid-Transports in Mitochondrien zu charakterisieren, war seine Sensitivität für die Inhibitoren CAT und BKA. Beide Inhibitoren hemmen auch im rekonstituierten System den Transport zu mehr als 95 %. Wird im Rekonstitutionsverfahren (Abb.35) nicht das nach Abschnitt 3.3.1. isolierte unbeladene Carrierprotein verwendet, sondern be-

nutzt man hierzu den CAT-Protein Komplex, dann erreicht die Austauschaktivität höchstens 2 % des Wertes mit dem unbeladenen (aktiven) Carrierprotein.

Dieses Experiment ist auch eine Bestätigung dafür, daß den ca 30 % an Fremdprotein, die nach der Carrierisolierung mit dem "batch-Verfahren" noch vorhanden sind, keine Bedeutung für die Rekonstitution des Transportvorgangs beizumessen ist. In früheren Versuchen wurde nämlich nachgewiesen (43,44), daß CAT ausschließlich an das Polypeptid mit Molekulargewicht 30 000 mit hoher Affinität bindet.

3.4.3.2.7. Vergleich der rekonstituierten Aktivität mit dem Adeninnucleotid-Carrier in Mitochondrien

Die Aktivität des rekonstituierten Proteins kann mit der ursprünglichen Aktivität des Carriers direkt verglichen werden.

In Mitochondrien aus Rinderherzen wurde für den Adeninnucleotid-Carrier bei 21°C eine Wechselzahl von 550 min^{-1} bestimmt (34). Dabei ist der Gehalt an Carrierprotein, das ein Dimer aus zwei Einheiten mit einem Molekulargewicht von je 30 000 darstellt(44), durch die Zahl der Bindungsstellen für CAT definiert. Im rekonstituierten System kann aus der optimal erreichten Rate (vgl. Tab XIV) die Wechselzahl zu 40 min^{-1} berechnet werden. Dies entspricht etwa 7 % der mitochondrialen Aktivität.

Ausgehend von diesem Wert erhebt sich die Frage, ob alle Carrierproteine gleichermaßen durch die Solubilisierung, die Isolierung und durch die Rekonstitutionsverfahren in diesem Ausmaß geschädigt worden sind, oder ob man durch diese Manipulationen einen Großteil der Carriermoleküle inaktiviert hat, wobei aber der nativ und funktionell aktiv gebliebene Rest eine mit dem ursprünglichen System vergleichbare Aktivität aufweist. Dazu wird in Tab.XVII ein Experiment geschildert, das

Proteingehalt

a) nach Lowry (50) :

23,5 µg Carrierprotein / ml Liposomen

= 390 pMol Carrier / ml Liposomen

b) bezogen auf die Bindung von ^3H -CAT:

29 pMol CAT gebunden / ml Liposomen

= 1,25 µMol CAT gebunden / g Carrierprotein (vgl. a)!!)

oder:

29 pMol Carrierprotein / ml Liposomen (vgl. Text)

= 1,75 µg aktives Carrierprotein / ml Liposomen

Nucleotid-Austausch

	Rekonstituiertes System bezogen auf		Mitochondrien aus Rinderherzen
	a) Lowry	b) CAT-Bind.	
Austausch (µMol/g)	175	2350	
Austauschgeschw. (µMol/g·min)	415	5585	
Wechselzahl (1/min)	25	335	550
Wechselzahl (in % der mitoch. Aktivität)	4,5	61	100

Tab. XVII Korrelation des Adeninnucleotid-Austauschs mit der Bindung von CAT

Der Austausch (intern und extern ADP) wurde bei 21°C, 1 mM MgCl_2 in Liposomen aus PC/DPG = 99/1 gemessen. Die Berechnungen erfolgten unter der Annahme eines Molekulargewichtes von 60 000 für den Adeninnucleotid-Carrier (= Dimer).

Die Bindung des Inhibitors CAT wurde in einem Versuch gemessen, wie er in Abschnitt 3.3.2. beschrieben ist.

eine Antwort auf diese Frage gibt. In diesem Versuch wird - wie bei Mitochondrien, vgl. (34) - der Austausch nicht nur auf die Proteinmenge bezogen, sondern auch mit der Zahl der Bindungsstellen für CAT korreliert, von der angenommen wird, daß sie die Zahl der aktiven Carriermoleküle repräsentiert. Durch das reaktivierende Beschallen wird die Bindung von CAT an das Carrierprotein zwar vermindert (vgl. dazu Tab.VII), andererseits wird aber deutlich, daß die restlichen aktiven Carriermoleküle eine Austauschaktivität besitzen, die durchaus mit der Aktivität des Adeninnucleotid-Carriers in der Membran von Mitochondrien aus Rinderherzen zu vergleichen ist.

4. DISKUSSION

4.1. Wechselwirkung des Carriers mit den Phospholipiden der Mitochondrienmembran

Die Frage nach einer spezifischen Wechselwirkung des Carriers mit den Phospholipiden der Mitochondrienmembran konnte mit den in Abschnitt 3.1.1. beschriebenen Methoden nicht beantwortet werden. Die Bestimmung der mit dem Carrier isolierten Phospholipide ergab eine Phospholipidverteilung, die recht genau der Verteilung in der inneren Mitochondrienmembran entspricht. Es gibt in der Literatur einige Beispiele für die spezifische Wechselwirkung eines Proteins mit bestimmten Phospholipiden, wie z.B. β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (2), Cytochromoxidase (8), Na, K - ATPase (86), Ca - ATPase (87,88) und Adenylcyclase (18); diese Ergebnisse wurden jedoch durch Rekonstitutionsversuche gewonnen und nicht durch eine Bestimmung nach der Isolierung.

Auch die Verwendung von Phospholipasen (Abschnitt 3.1.2.) konnte nicht den Nachweis für die erwartete Wechselwirkung des positiv geladenen Carrierproteins mit negativ geladenen Phospholipiden erbringen. In Experimenten mit Phospholipasen verschiedener Spezifität wurde durch kontrollierten Abbau von mitochondrialen Phospholipiden und anschließender Entfernung der hemmenden Reaktionsprodukte mit Albumin der Einfluß des Phospholipidabbaus auf die Transportaktivität untersucht. Dabei konnte in ergänzenden Versuchen sichergestellt werden, daß die beobachteten Wirkungen nicht auf einer Verminderung der Bindungsaffinität für Adeninnucleotide beruht. Trotz des unterschiedlichen Musters der abgebauten Phospholipide bei den verwendeten Phospholipasen konnte mit der Phospholipase A₂ aus Schweinepankreas, die bevorzugt Cardiolipin angreift, keine höhere Inaktivierung des Adeninnucleotid-Transportes erreicht werden als mit der Phos-

pholipase A₂ aus Schlangengift, die nur Phosphatidyl-
äthanolamin und Lecithin abgebaut.

Kürzlich wurde von Spencer et al. (89) ein deutlicher Unterschied in der Wirkung der beiden Phospholipasen berichtet und daraus auf eine spezifische Wechselwirkung des Adeninnucleotid-Carriers mit Cardiolipin und Phosphatidyläthanolamin geschlossen. Dabei wurden die mit Phospholipase behandelten Mitochondrien jedoch nur einmal mit Albumin-haltigem Puffer gewaschen. Eigene Untersuchungen zeigten, daß dann noch beträchtliche Mengen an Lyso-Phospholipiden vorhanden sind, die die beobachteten Effekte hervorrufen können.

In Abschnitt 3.1.3. schließlich wurde der Einfluß des Detergens LAPAO, das später für die Solubilisierung des Adeninnucleotid-Carriers verwendet wird (vgl. Abschnitt 3.2.), auf den Transport von ADP und ATP untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die in die Mitochondrienmembran inkorporierten Detergensmoleküle die Funktion des Carrierproteins zwar stark hemmen, daß aber eine Verminderung der Konzentration an LAPAO in der Mitochondrienmembran ein Wiedererscheinen der Transportfunktion zur Folge hat. Diese Befunde sind wichtig zur Abschätzung einer Hemmwirkung durch das Detergens LAPAO im rekonstituierten System, außerdem zeigen sie, daß das Carrierprotein durch LAPAO nicht irreversibel denaturiert wird. Durch Ergebnisse bei der Transportrekonstitution werden diese Versuche bestätigt (Abschnitt 3.4.3.2.2.). Dort ist ebenfalls eine schnelle und wirksame Inaktivierung des Transports von Adeninnucleotiden durch das in die Phospholipidmembran miteingebaute Detergens zu beobachten, wenn eine bestimmte Konzentration an LAPAO überschritten wird.

4.2. Isolierung und Charakterisierung des Adeninnucleotid-Carriers

Die Einführung von LAPAO als Detergens zur Solubilisierung der Mitochondrienmembran brachte entscheidende Vorteile für die Isolierung und Rekonstitution des Adeninnucleotid-Carriers:

1. Die Anwendung von LAPAO ermöglicht die Isolierung des unbeladenen Carrierproteins. Dieses wiederum bildet die Grundlage für alle weiteren Versuche zur Rekonstitution des ADP,ATP-Carriers.
2. Die Menge des zur Solubilisierung notwendigen Detergens konnte im Vergleich zu Triton X-100 auf ein Viertel gesenkt werden. Dies ist für die folgenden Experimente zur Rekonstitution wichtig, da das notwendigerweise zusammen mit dem Protein eingebaute Detergens die Membranstruktur stört.
3. Ähnlich wie mit Triton X-100 (aber nicht mit Cholat oder Desoxychlat) bleibt eine Bindung von CAT und BKA an das Carrierprotein während der Solubilisierung von Mitochondrien, die zuvor mit Inhibitoren beladen worden waren, erhalten. Dies ist ein Ausdruck für die schonenden Bedingungen bei der Solubilisierung durch nichtionische Detergentien (Triton, LAPAO) im Vergleich zu ionischen (Cholat, Desoxycholat).

Die Versuche zur Stabilität des isolierten Carrierproteins in seinen verschiedenen Formen (Abschnitt 3.2.2.) zeigen die hohe Empfindlichkeit des unbeladenen Carriers gegen einen proteolytischen Angriff. Der stabilisierende Effekt eines gebundenen Liganden - in diesem Fall CAT oder BKA - ist eine Erscheinung, die auch von vielen anderen Proteinen bekannt ist (90). Die Anwendung des "batch-Verfahrens" zur schnellen Isolierung des Carriers war daher notwendig, um für die Rekonstitutionsversuche ein natives und funktionell aktives Protein zu gewinnen.

Durch eine Reihe von Experimenten in Abschnitt 3.2.3. wurde die völlige Identität des CAT-Protein Komplexes mit dem unbeladenen Carrierprotein bezüglich des Proteinanteiles nachgewiesen. Die Ergebnisse proteinchemischer oder spektroskopischer Untersuchungen, die nur an dem bedeutend stabileren CAT-Protein Komplex möglich sind, können somit direkt für den unbeladenen Carrier übernommen werden.

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Reinheit des isolierten ADP,ATP-Carriers (vgl. Abschnitt 3.2.1.). Neben den Ergebnissen der SDS-Gelelektrophorese (Abb.17) und der Präzipitation mit Antikörpern (Abb.20) sind besonders Untersuchungen mit den entsprechenden Inhibitor-Protein Komplexen aussagekräftig, die von Aquila et al. (78) durchgeführt wurden :

Während sich der isolierte CAT-Protein Komplex als völlig resistent gegenüber einem proteolytischen Angriff durch Trypsin erweist, wird der BKA-Protein Komplex in kurzer Zeit vollständig abgebaut. Diese eindeutige Abhängigkeit der Proteaseempfindlichkeit, d.h. der Proteinkonformation von spezifischen Liganden des Adeninnucleotid-Carriers kann von anderen Proteinen, sollten sie in der gereinigten Carrier-Präparation in nennenswertem Ausmaß anwesend sein, nicht erwartet werden.

4.3. Rekonstitution von Inhibitorbindung und Transport von Adeninnucleotiden im künstlichen System

4.3.1. Rekonstitutionsverfahren

Eine ganze Palette von verschiedenen Methoden wurde im Laufe der Jahre zur Rekonstitution von Proteinen mit Phospholipiden angewandt (91). Angefangen mit einem heute sehr einfach anmutenden Verfahren, der Cholatver-

dünnung (92) ging die Weiterentwicklung über die häufig angewandte Methode der Cholatdialyse (93) und die seltener verwendete Gelfiltration (94) zur gemeinsamen Beschallung der einzelnen Komponenten mit Ultraschall (95). In jüngster Zeit wurden noch Verfahren zur direkten Inkorporation von Proteinen in Phospholipidmembranen (96) und die sogenannte "freeze-thaw-sonication" (31) beschrieben.

Unabhängig von der zuletzt erwähnten Methode der direkten Inkorporation wurde in dieser Arbeit ein ähnliches Verfahren entwickelt, das einen unmittelbaren Einbau des solubilisierten Carrierproteins in präformierte Liposomen gewährleistet. Nachdem die ersten drei der oben geschilderten Methoden nicht anwendbar waren, da Cholat kein geeignetes Detergens zur Isolierung des reinen Adennucleotid-Carriers ist, und nachdem eine gemeinsame Beschallung von Protein und Phospholipid zur weitgehenden Inaktivierung des Carrierproteins führte, wurde die direkte Inkorporation in vorgefertigte Liposomen als Methode der Wahl entwickelt.

Für den vollständigen Einbau des Proteins in die Phospholipidmembranen der Liposomen sprechen mehrere Argumente:

1. In Experimenten mit einer gelchromatographischen Auftrennung über Sepharose 6B Säulen (Abschnitt 3.3.1.) wird das gesamte zugegebene Carrierprotein zusammen mit den Liposomen eluiert.
2. Der Adennucleotid-Carrier zeigt mit seinem spezifischen Antikörper keinerlei Präzipitationsreaktion mehr, wenn in der Inkubation gleichzeitig Liposomen anwesend sind (Abschnitt 3.3.1.).
3. In Versuchen zur Rekonstitution der Inhibitorbindung (Abschnitt 3.3.2. - 3.3.4.) ändert das Carrierprotein seine Bindungs- und Konformationseigenschaften drastisch, wenn Phospholipid-Vesikel zugegeben werden.

Aus der Literatur sind einige Beispiele bekannt, in denen ein Protein mit einer bevorzugten Ausrichtung in die Phospholipidmembran eingebaut wird (17,96 - 98). Experimente mit den Inhibitoren CAT und BKA (Abschnitt 3.3.4.) zeigen jedoch, daß in dem hier untersuchten Fall eine gleichmäßige Verteilung beim Einbau vorherrscht. Je die Hälfte der Carriermoleküle zeigt mit der Bindungsstelle nach außen bzw. nach innen.

Der interessanteste Punkt des Rekonstitutionsverfahrens (vgl. Abb.35), die Bedeutung der reaktivierenden zweiten Beschallung ist noch weitgehend ungeklärt. Einerseits ist die Ultraschalleinwirkung für die Funktion des Proteins eindeutig schädlich (Abschnitt 3.4.3.2.7.), andererseits jedoch ist die Nachbeschallung essentiell für die Rekonstitution der Transportfunktion (Abb.34). In Abb.34 wird der Kompromiß zwischen diesen beiden Wirkungen deutlich: Im ersten Teil der Kurve überwiegt der positive Einfluß der Rekonstitution des Austausches durch die Ultraschallbehandlung, während nach und nach die Inaktivierung des Carrierproteins durch die Beschallung die Oberhand gewinnt.

Mehrere Möglichkeiten, diesen Rekonstitutionseffekt zu erklären, sind denkbar:

1. Die Liposomen, in die der Carrier eingebaut wird, brechen zusammen und werden erst in der zweiten Beschallung wieder zu geschlossenen und damit transportaktiven Phospholipid-Vesikeln. Gegen diese Erklärung sprechen jedoch die in Abschnitt 3.3.1. gezeigten Versuche zur Stabilität der Liposomen gegenüber LAPAO (Abb.21).
2. In den Membranen der Liposomen, in die der Carrier inkorporiert wird, herrscht eine hohe Detergensenkonzentration, die inaktivierend wirken könnte (vgl. Abschnitt 3.1.3.). Das Detergens kann nun durch die zweite Beschallung zwischen den einzelnen Phospholi-

pid-Vesikeln verteilt werden, so daß anschließend eine geringere, nicht mehr vollständig hemmende Konzentration an LAPAO in den Liposomen mit dem eingebauten Protein herrscht. Gegen diese Interpretation sprechen jedoch Versuche, in denen der inkorporierte Carrier 24 Stunden lang mit Liposomen inkubiert wurde. Auch nach dieser Zeit, die eine Äquilibration des Detergens zwischen den Liposomen sicher gewährleistet (45), war eine ähnliche Abhängigkeit von einer zusätzlichen Beschallung festzustellen, wie sie in Abb.34 geschildert ist.

3. Die Auftrennung von Liposomen über Sepharose 4B (entsprechend der Abb.3) zeigt, daß nach der Inkorporation das Carrierprotein fast ausschließlich in inaktiver Form in den großen Vesikeln (im Ausschlußvolumen der Säule) akkumuliert ist. Nach der Beschallung jedoch wird der Carrier z.T. in den Bereich kleinerer Vesikel verschoben. Die nach der Inkorporation inaktiven großen Vesikel besitzen eventuell multilamellare Membranen, die die Bindung von Liganden an das eingebaute Protein zulassen, nicht aber den Transport von hydrophilen Molekülen durch die mehrschichtige Membran.

4.3.2. Rekonstitution der Inhibitorbindung

Die Wiederherstellung der spezifischen Bindung von CAT und BKA an das Carrierprotein nach dem Einbau in künstliche Phospholipidmembranen war der erste Schritt auf dem Weg zur Rekonstitution des Adeninnucleotid-Carriers. Die gemessenen Werte der Affinität zwischen dem Protein und dem Inhibitorligand stimmen sehr gut mit den Werten in intakten Mitochondrien überein. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß zumindest derjenige Anteil des Carriers, der eine rekonstituierte Bindungsfähigkeit zeigt (ca 30 - 40 %, vgl. Tab.VII und Tab.VIII), in nativer

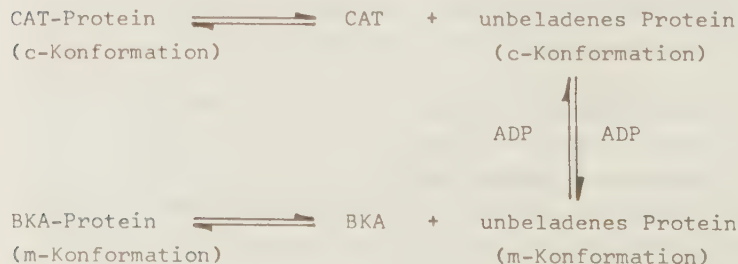
Konformation vorliegt. Wichtiger jedoch war die zweite Stufe der Rekonstitution, die Wiederherstellung der Sensibilität und der Spezifität des Carrierproteins für verschiedene Nucleotide und die damit verbundenen Konformationseigenschaften.

Die folgenden Ergebnisse können jetzt zusammenfassend eingeordnet werden:

- Die Abhängigkeit der Bindung von BKA von der Anwesenheit von ADP oder ATP (Abb.26 und Abb.27),
- die Spezifität und die mit Mitochondrien vergleichbare Affinität von ADP und ATP (Tab.IX),
- die Bedeutung der Adeninnucleotide für den Konformationswechsel des Carrierproteins, der durch Verdrängungsexperimente (Abb.28, Abb.32, Tab.XI) und Versuche mit gleichzeitiger Bindung beider Inhibitoren (Abb.30) gezeigt wurde.

Alle diese Befunde machen folgendes Schema wahrscheinlich (34):

1. Das isolierte Carrierprotein befindet sich vorherrschend in der c-Konformation; zur Umwandlung in die m-Konformation, die BKA binden kann, ist ADP notwendig (vgl. dazu Abschnitt 1.2.).
2. In allen Experimenten mit dem rekonstituierten System schließt sich - wie in Mitochondrien - die Bindung von CAT und BKA gegenseitig aus.
3. Die Umwandlung zwischen den beiden Konformationen kann in folgender Sequenz beschrieben werden:



Eine Bindung von ADP an das Carrierprotein konnte im rekonstituierten System nicht gemessen werden. Möglicherweise ist die Bindung so schwach ($K_d > 10^{-5}M$), daß sie mit den auf das Liposomensystem anwendbaren Methoden nicht nachgewiesen werden kann. Ein stabiler ternärer Komplex zwischen ADP, BKA und Carrierprotein, wie er von Vignais (84) vorgeschlagen wird, konnte jedoch zumindest für das rekonstituierte System ausgeschlossen werden.

4.3.3. Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports

In der dritten Stufe der Rekonstitution schließlich konnte durch die in Abschnitt 4.3.1. diskutierten Schritte eine Wiederherstellung des Adeninnucleotid-Transports mit dem inkorporierten Carrierprotein erreicht werden.

Dieser Schritt wurde durch mehrere Vorstufen erreicht: Die Untersuchungen zur Mobilität des Carrierproteins in den künstlichen Membranen (Abschnitt 3.4.1.) zeigten, daß die Bindungsstelle des Proteins zwar "beweglich" ist und daß sich diese Eigenschaft weitgehend durch ADP beeinflussen läßt, jedoch war im Vergleich zu Mitochondrien die Mobilität zu gering, um meßbare Transportraten zu ermöglichen. Andererseits war aus den vorhergehenden Stufen der Rekonstitution bekannt (Abschnitt 3.3.), daß das inkorporierte Carrierprotein in nativem Zustand vorliegt; auch die Suche nach einem Protein-Cofaktor, der für die Rekonstitution der Transportfunktion notwendig sein könnte (Abschnitt 3.4.2.1.), verlief erfolglos. Nach dem Einbau des isolierten Proteins in große Liposomen mit geringer Membrankrümmung, die nach der Ätherverdampfungsmethode hergestellt worden waren (Abschnitt 3.4.2.2.), trat zwar ein Transport von Adeninnucleotiden auf, jedoch in so geringem Ausmaß, daß kaum von einer Rekonstitution gesprochen werden konnte. Erst die nachträgliche Beschallung von Liposomen mit dem eingebauten

Protein führte zu einer Wiederherstellung des ADP,ATP-Transports mit beträchtlichem Ausmaß.

Die Kinetik des Transportvorganges (Abb.36 und Abb.37) zeigt, daß zumindest im Anfangsbereich von einem annähernd homogenen Verlauf gesprochen werden kann, wenn auch die unterschiedliche Größe der Adeninnucleotid-Pools in den verschiedenen Liposomen Probleme aufwerfen kann. Dabei ist zu beachten, daß bei den gemessenen Innenvolumina der Vesikel ($0,35 \mu\text{l}/\mu\text{Mol}$ Phospholipid) und der beobachteten Transportaktivität schon in den ersten 10 - 20 sec eine vollständige Äquilibrierung des inneren mit dem äußeren Adeninnucleotid-Pool in einem Großteil der Vesikel eintreten kann.

Bei niederen Proteinkonzentrationen ist die theoretisch zu erwartende lineare Abhängigkeit der Menge an ausgetauschten Nucleotiden von der Menge an eingebautem Carrierprotein erfüllt (Abb.38). Bei den Werten von mehr als 2 mg Carrier/g Phospholipid tritt keine Erhöhung der Gesamtmenge an transportierten Nucleotiden mehr auf, obwohl die Austauschgeschwindigkeit im Anfangsbereich der Kinetik unverändert bleibt. Dies kann durch Sättigung der für den Transport geeigneten Vesikel mit Carrierprotein erklärt werden.

Die Untersuchungen zur Phospholipidspezifität (Abschnitt 3.4.3.2.3.) des rekonstituierten Adeninnucleotid-Transports beweisen eine Abhängigkeit des Austauschs von der Anwesenheit von negativ geladenen Phospholipiden. Dabei ist Cardiolipin wirksamer als Phosphatidsäure, wird jedoch noch übertroffen durch extrahierte mitochondriale Phospholipide. Die optimale Aktivierung durch die mitochondrialen Phospholipide kann entweder auf weiteren Komponenten (Phosphatidylinositol) oder auf dem höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren beruhen.

Sehr wichtig für die Beurteilung der Qualität des rekonstituierten Systems sind die Ergebnisse zur Nucleotid-

spezifität (Abschnitt 3.4.3.2.5.). Die Ergebnisse, die wie in Mitochondrien eine Spezifität für ADP und ATP gegenüber AMP und GDP verdeutlichen, beweisen ebenfalls die Nativität des rekonstituierten Adeninnucleotid-Carriers.

Ein entscheidendes Charakteristikum jeder Rekonstitution ist der Vergleich der Aktivität des künstlichen mit dem natürlichen System (Abschnitt 3.4.3.2.7.). Mit dem hier beschriebenen System wurde eine Rekonstitution von bis zu 7 % der mitochondrialen Aktivität erreicht. In weiteren Versuchen konnte die wichtige Frage, ob die inkorporierten Carriermoleküle entweder gleichmäßig in diesem Ausmaß inaktiviert sind (7 % Restaktivität des Carrierproteins) oder ob nur dieser Bruchteil der Carriermoleküle aktiv ist (7 % aktive Carriermoleküle), zugunsten der zweiten Alternative beantwortet werden. Es bleiben jedoch weiterhin zwei Möglichkeiten, diese Befunde zu erklären: Entweder bringen die zur Rekonstitution des Adeninnucleotid-Carriers notwendigen Methoden der Solubilisierung, Isolierung und Inkorporation die Inaktivierung eines Großteils des Carrierproteins mit sich, oder die verwendete Rekonstitutionsmethode vermag nur einen kleinen Teil der nativen, inkorporierten Carriermoleküle in einen funktionell aktiven Zustand zu versetzen.

Die in letzter Zeit erschienen Arbeiten von Shertzer und Racker (26 - 28) zur Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports können jetzt im Licht der hier beschriebenen Ergebnisse beurteilt werden. Entscheidend ist, wie schon im Abschnitt 1.1. erörtert, die Reinheit der Ausgangsprodukte. In Abb.40 ist das nach der Methode von Shertzer und Racker (Solubilisierung mit Cholat, Fällung mit Ammoniumsulfat) isolierte Polypeptidgemisch aus submitochondrialen Partikeln (A) und aus sogenannten

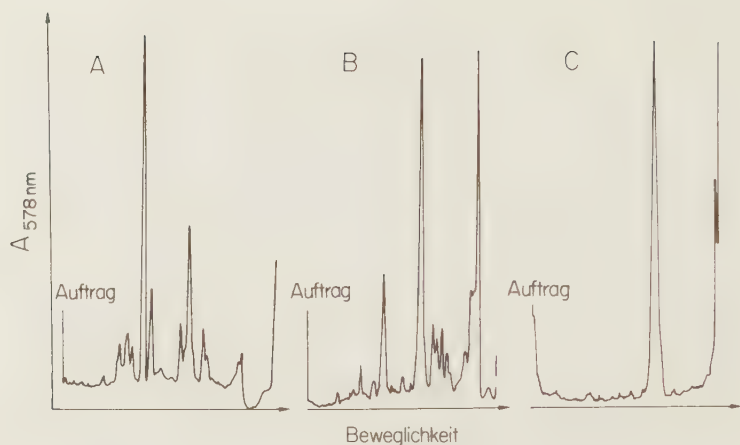


Abb.40 Polypeptidzusammensetzung verschiedener Präparationen des Adeninnucleotid-Carriers
Präparationen aus submitochondrialen Partikeln (A) (nach 26 und 27), aus "ASUA-Partikeln" (B) (nach 28) und nach der in dieser Arbeit beschriebenen Methode (C). Alle anderen Bedingungen wie Abb.17.

"ASUA-Partikeln" (B) mit dem nach der hier beschriebenen Methode isolierten Carrier (C) verglichen. Durch die Isolierung (A), die in (26 und 27) verwendet wurde, erhält man nur eine geringe Anreicherung des Carrierproteins und auch die verbesserte Extraktion (B), in (28) angewendet, führt zu einem unsauberen Präparat. Mit diesen Ausgangssubstanzen sind keine eindeutigen Korrelationen zwischen molekularen Parametern und funktionellen Größen bei der Rekonstitution möglich. Weiterhin werden in den Arbeiten von Shertzer und Racker (26,27) auf der Basis einer Kinetik, die sich aus einem einzigen Wert bei 10 sec berechnet, sehr geringe Transportraten erreicht, die weniger als 1 % der mitochondrialen Aktivität entsprechen.

In der Einleitung wurden Kriterien für eine sinnvolle Rekonstitution aufgestellt; abschließend soll geprüft werden, ob die vorgestellte Arbeit selbst diesen Kriterien genügt. Neben der geforderten Reinheit der Ausgangsprodukte, die weitgehend erfüllt ist, wurde als Ziel nicht die bloße Wiederherstellung der Funktion dargestellt, sondern die Lösung von Fragen, die im ursprünglichen System nicht oder nur sehr schwer möglich ist. Auch diese Forderung wurde in der vorliegenden Arbeit in mehreren Punkten erfüllt:

1. Die Bestimmung der Affinität von BKA zum Carrierprotein ($K_d = 0,08 \mu M$) war wegen der unspezifischen Adsorption an die Mitochondrienmembran erst im rekonstituierten System möglich.
2. Die Abhängigkeit der Konformationsumwandlungen, die das Carrierprotein zeigt, von anwesendem ADP kann in Mitochondrien wegen der vorhandenen internen Nucleotide nur sehr schwer untersucht werden.
3. In Abschnitt 3.1. wurden Experimente zur Wechselwirkung des Carriers mit Phospholipiden beschrieben. Eine Klärung dieser Frage war durch Untersuchungen an intakten Mitochondrien jedoch nicht möglich. Erst im rekonstituierten System gelang der Nachweis, daß der Transport von ADP durch die Membran mit Hilfe des Adennucleotid-Carriers - nicht aber die Bindung von Inhibitoren - die Anwesenheit negativ geladener Phospholipide benötigt.
4. Über diesen Ergebnissen darf nicht vergessen werden, daß erst die Rekonstitution des ADP,ATP-Carriers im künstlichen Vesikelsystem den eindeutigen Nachweis erbrachte, daß das schon seit 1974 (99) als CAT bindendes Protein bekannte Polypeptid mit dem Molekulargewicht von 30 000 - wahrscheinlich als Dimer - das vollständige System des Adennucleotid-Transports darstellt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Transport von Adeninnucleotiden durch die innere Mitochondrienmembran ist einer der aktivsten biologischen Transportvorgänge und zugleich einer der am besten untersuchten Transportmechanismen in Membranen. Der ATP, ADP-Transport ist die einzige Verbindung zwischen den inner- und außermitchondrialen Reaktionen der Phosphatübertragung.

Seit längerer Zeit ist in der Mitochondrien-Innenmembran ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca 30 000 bekannt, an das als einziges Membranprotein der für den Adeninnucleotid-Transport spezifische Hemmstoff Carboxyatractylat (CAT) nach der Solubilisierung und Isolierung auf Grund hoher Affinität gebunden bleibt. Dieses Polypeptid, in dem die Funktion des Adeninnucleotid-Carriers vermutet wurde, macht ca 10 % des Proteinanteils der Mitochondrienmembran aus. Mit dem als CAT-Protein Komplex isolierten Polypeptid war wegen des gebundenen Inhibitors keine Bestimmung der Carrierfunktion möglich.

Versuche zur Rekonstitution des Adeninnucleotid-Transports in künstlichen Phospholipidmembranen sollten folgende Fragen klären:

1. Besteht eine eindeutige Korrelation zwischen dem isolierten Polypeptid mit dem Molekulargewicht 30 000 und der Funktion des ADP,ATP-Transports?
2. Liegt das Polypeptid nach der Solubilisierung und der Isolierung in einem nativen und nicht denaturierten Zustand vor?
3. Stellt das Protein, das in der Membran spezifisch den Hemmstoff CAT bindet, das vollständige System des Adeninnucleotid-Transports dar, oder sind Cofaktoren erforderlich?

4. Wenn eine Rekonstitution des Transports mit dem isolierten Protein möglich ist, dann sollte die Abhängigkeit des wiederhergestellten Austauschvorganges von Membraneigenschaften (z.B. Phospholipidspezifität) getestet und die Charakterisierung im Vergleich zum mitochondrialen System (Spezifität, Aktivität) erreicht werden.

Die Lösung dieser Probleme wurde in mehreren Schritten erreicht, die schließlich zur Rekonstitution des Adeninnucleotid-Austausches in künstlichen Phospholipidmembranen führten:

1. Durch Anwendung des Detergens 3-Lauramido-N,N-dimethylpropyl-aminoxid (LAPAO) gelang die Isolierung des inhibitorfreien Carrierproteins aus Rinderherzmitochondrien, das die Grundlage für alle weiteren Versuche bildete.
2. Die Identität des solubilisierten unbeladenen Carriers mit dem bekannten CAT-Protein Komplex bezüglich des Proteinanteils wurde nachgewiesen.
3. Das isolierte Carrierprotein wurde in künstliche Phospholipidmembranen eingebaut. Die vollständige Inkorporation wurde bewiesen.
4. Mit dem eingebauten Protein war die Rekonstitution der Bindung von CAT und Bongkrekat (BKA) in beträchtlichem Ausmaß und mit vollständig wiederhergestellter Bindungsaffinität möglich. Diese Eigenschaften waren nach der Solubilisation verschwunden.
5. Im gleichen System konnte die Abhängigkeit der BKA-Bindung von Adeninnucleotiden gezeigt werden. Es wurde die gleiche Spezifität und Affinität gemessen, wie sie für die Bindung der Nucleotiden an Mitochondrien aus Rinderherzen bekannt ist.
6. In Verdrängungsversuchen mit beiden Inhibitoren wurde die gleichmäßige Verteilung der Bindungsstellen auf beiden Seiten der Membran, d.h. der ungerichtete Ein-

bau des Proteins nachgewiesen.

7. Die Erweiterung der Rekonstitutionsmethode durch eine zusätzliche Ultraschallbehandlung führte zur Wiederherstellung des Adeninnucleotid-Austausches im künstlichen Vesikelsystem.
8. Der rekonstituierte Transport von Adeninnucleotiden zeigte hohe Spezifität für ADP und ATP und war von der Anwesenheit von zweiwertigen Kationen und von negativ geladenen Phospholipiden in der Membran abhängig.
9. Das Ausmaß der Rekonstitution betrug bis zu 7 % der ursprünglichen Aktivität des Adeninnucleotid-Carriers in Mitochondrien aus Rinderherzen.

Das System des rekonstituierten Adeninnucleotid-Transports in künstlichen Phospholipid-Vesikeln stellt eine geeignete Grundlage dar, um weitere wichtige Fragen nach der Elektrogenität des ADP,ATP-Austausches und nach der Wechselwirkung des Carriers mit anderen Membranproteinen beantworten zu können.

6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

BJA	Bongkrekat
BSA	Rinderseerumalbumin
CAT	Carboxyatractylat
DPG	Cardiolipin (Diphosphatidyl-glycerol)
EDTA	Äthylendiamin-teraaetat
EGTA	Äthylenglycol-bis(ß-aminoäthyläther)- N,N-tetraacetat
LAPAO	3-Lauramido-N,N-dimethylpropyl-aminoxid
Lyso-DPG	Lyso-Cardiolipin
Lyso-PC	Lyso-Lecithin
Lyso-PE	Lyso-Phosphatidyläthanolamin
MPL	Mitochondriale Phospholipide
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin (Lecithin)
PE	Phosphatidyläthanolamin (Kephalin)
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipid
PS	Phosphatidylserin
RHM	Rinderherzmitochondrien
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
Tricine	N-tris(hydroxymethyl)methylglycin

7. LITERATUR

1. Gazzotti, P., Bock, H.G. und Fleischer, S. (1974), Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 309
2. Grover, A.K., Slotboom, A.J., Haas, G.H. und Hammes, G.G. (1975), J. Biol. Chem. 250, 31
3. Kimelberg, H.K. und Papahadjopoulos, D. (1972), Biochim. Biophys. Acta 282, 277
4. Meissner, G. und Fleischer, S. (1974), Meth. Enzym. 32, 475
5. Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, A. und Kagawa, Y. (1977), Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 936
6. Kagawa, Y. und Racker, E. (1966), J. Biol. Chem. 241, 2467
7. Racker, E. (1972), J. Membr. Biol. 10, 221
8. Jost, P.C., Griffith, O.H. und Capaldi, R.A. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 480
9. Drachev, L.A., Jasaitis, A.A., Kaulen, A.D., Kondrashin, A.A., Chu, L.U., Semenov, A.Y., Severina, I.I. und Skulachev, V. (1976), J. Biol. Chem. 251, 7072
10. King, T.E. und Baugh, R.F. (1974), in "Dynamicx of Energy Transducing Membranes"; Hrsg. Ernster, Estabrook, Slater; Elsevier, Amsterdam
11. Ragan, I. und Widger, W.R. (1975), Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 744
12. Rogers, M.J. und Strittmatter, P. (1973), J. Biol. Chem. 248, 800
13. Lu, A.Y.J. und Wayne, L. (1974), Biochem. Biophys. Acta 344, 205
14. Ingelman-Sundberg, M. und Glaumann, H. (1977), FEBS Lett. 78, 72
15. Racker, E. und Stoeckenius, W. (1974), J. Biol. Chem. 249, 662
16. Kayushin, L.P. und Skulachev, V.P. (1974), FEBS Lett. 39, 39
17. Happe, M., Teather, R.M., Overath, P., Knobling, A. und Oesterhelt, D. (1977), Biochim. Biophys. Acta 465, 415

18. Levey, G.S. (1972), Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 108
19. Hilden, S. und Hokin, L. (1976), Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 521
20. Sweadner, K.J. und Goldin, S.M. (1975), J. Biol. Chem. 250, 4022
21. Racker, E. und Eytan, E. (1973), Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 174
22. Drachev, L.A., Jasaitis, A.A., Mikelsaar, A., Nemecek, I.B., Semenov, A.Y., Semenova, G., Severina, I.I. und Skulachev, V.P. (1976), J. Biol. Chem. 251, 7077
23. Banerjee, R.K., Shertzer, H.C., Kanner, B.I. und Racker, E. (1977), Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 772
24. Storelli, C., Vögeli, H. und Semenza, G. (1972), FEBS Lett. 24, 287
25. Gautheron, D.C., Julliard, J.H. und Godinot, C. (1974) in "Membranes in Transport and Phosphorylation", Hrsg. Azzone, Klingenberg, Quagliariello, Sili-prandi; North Holland Publ. Comp., Amsterdam
26. Shertzer, H.G. und Racker, E. (1973), J. Biol. Chem. 249, 1320
27. Shertzer, H.G. und Racker, E. (1975), J. Biol. Chem. 251, 2446
28. Shertzer, H.G., Kanner, B.I., Banerjee, R.K. und Racker, E. (1977), Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 779
29. Crane, R.K., Malathi, P. und Preiser, H. (1976), FEBS Lett. 67, 214
30. Crane, R.K., Malathi, P. und Preiser, H. (1976), Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 1010
31. Kasahara, M. und Hinkle, P.C. (1976), Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 396
32. Pfaff, E. und Klingenberg, M. (1968), Eur. J. Bioch. 6, 66
33. Pfaff, E., Heldt, H.W. und Klingenberg, M. (1969), Eur. J. Bioch. 10, 484
34. Klingenberg, M. (1975) in "The Enzymes of Biological Membranes: Membrane Transport", Vol. 3, Hrsg. Martonosi, A.N.; Plenum Publ. Corp., New York/ London, S. 383

35. Klingenberg, M. (1975), in "Mitochondria, Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure", Hrsg. Packer, L. und Gomez-Puyou, A., Acad. Press, New York/ London, S. 127
36. Klingenberg, M., Riccio, P., Aquila, H., Buchanan, B. B. und Grebe, K., in "Membrane bound Enzymes", Plenum Publ. Corp., New York
37. Vignais, P. V. (1976), Biochim. Biophys. Acta 456, 1
38. Piozzi, F., Quilico, A., Mondelli, R. Ajello, T., Sprio, V. und Meleva, A. (1966), Tetrahedron, Suppl. 8, Teil II, 515
39. Riccio, P., Scherer, B. und Klingenberg, M. (1973), FEBS Lett. 31, 11
40. Henderson, P. J. F. und Lardy, H. A. (1970), J. Biol. Chem. 245, 1319
41. Klingenberg, M., Scherer, B., Stengel-Rutkowski, L., Buchholz, M. und Grebe, K. (1973), in "Mechanism in Bioenergetics", Hrsg. Racker, E., Acad. Press, New York/London
42. Klingenberg, M. (1977), Eur. J. Bioch. 76, 553
43. Riccio, P., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1975), FEBS Lett. 56, 129
44. Riccio, P., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1975), FEBS Lett. 56, 133
45. Beyer, K. und Klingenberg, M. (1977), Biochemistry, im Druck
46. Rouser, G. und Fleischer, S. (1967), Meth. Enzym. 10, 385
47. Kagawa, Y. und Racker, E. (1971), J. Biol. Chem. 246, 5477
48. Babel, W., Aquila, H., Beyer, K. und Klingenberg, M. (1976), FEBS Lett. 61, 124
49. Bernardi, G. (1971), Meth. Enzym. 22, 325
50. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, A. J. (1951), J. Biol. Chem. 193, 265
51. Bode, C., Goebell, H. und Stähler, E. (1967), Z. Klin. Chem. Klin. Bioch. 23, 555

52. Chen, P.S., Jr., Toribara, T.Y. und Warnev, H. (1956),
Anal.Chem. 28, 1756
53. Keenan, R.W., Schmidt, G. und Tanaka, T. (1968), Anal.
Bioch. 23, 555
54. Gawargious, Y.A. und Asworth, M.R.F. (1971), Z.Anal.
Chem. 174, 257
55. Garewal, H.S. (1973), Anal.Bioch. 54, 319
56. Bernheim, F., Bernheim, M.L.L. und Wilbur, K.M. (1947)
J.Biol.Chem. 174, 257
57. Neville, D.M. und Glossmann, H. (1974), Meth.Enzym.
32, 92
58. Löw, H. und Vallin, I. (1963), Biochim.Biophys.Acta
69, 361
59. Huang, C. und Charlton, J.P. (1972), Biochem.Biophys.
Res. Commun. 46, 1660
60. Andrews, S.B., Hoffmann, R.M. und Borison, A. (1975)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 65, 913
61. Deamer, D. und Bangham, A.D. (1976), Biochim.Biophys.
Acta 443, 629
62. Weidemann, M.J., Erdelt, H. und Klingenberg, M. (1970),
Eur.J.Bioch. 16, 313
63. Gasko, O.D., Knowles, A.F., Shertzer, H.G., Suolina, E.M.
und Racker, E. (1976), Anal.Bioch. 72, 57
64. Riccio, P., unveröffentlicht
65. Folch, J., Lees, M. und Sloane-Stanley, G.H. (1957),
J.Biol.Chem. 226, 497
66. Munn, E.A. (1974), "The Structure of Mitochondria",
Academic Press, London/New York
67. Lin, Y., Means, G.E. und Feeney, R.E. (1969), J.Biol.
Chem. 244, 789
68. Salach, J.I., Seng, R., Tisdale, H. und Singer, T.P.
(1971), J.Biol.Chem. 246, 340
69. Scatchard, G. (1949), Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660
70. Verkleij, A.J., Zwaal, R.F.D., Roelofsen, B., Comfurius,
P., Kastelijn, D. und von Deenen, L.L.M. (1973),
Biochim.Biophys.Acta 323, 178

71. Duszynski, J. und Wojtcak, L. (1974), FEBS Lett. 40, 72
72. Chap, H.J., Comfurius, P., van Deenen, L.L.M., van Zoelen, E.J.J. und Zwaal, R.F.A. (1977), Vortrag im FEBS-Kongreß, Kopenhagen, August 1977
73. Klingenberg, M., Aquila, H., Krämer, R., Babel, W. und Feckl, J. (1977), in "Biochemistry of Membrane Transport", Hrsg. Semenza, G. und Carafoli, E., Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, S. 567
74. Krämer, R. Aquila, H und Klingenberg, M (1977), Biochemistry 16, 4949
75. Boxer, D.H. (1975), FEBS Lett. 59, 149
76. Boxer, D.H., Feckl, J. und Klingenberg, M. (1977), FEBS Lett. 73, 43
77. Capaldi, R.A., Komai, H. und Hunter, D.R. (1973), Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 655
78. Aquila, H. und Klingenberg, M. (1978), Eur. J. Bioch., im Druck
79. Buchanan, B.B., Eiermann, W., Riccio, P., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1976), Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 2280
80. Krämer, R. und Klingenberg, M. (1977), Biochemistry 16, 4954
81. Inoue, K. und Kitagawa, T. (1976), Biochem. Biophys. Acta 426, 1
82. Klingenberg, M., Grebe, K. und Scherer, B. (1973), Eur. J. Bioch. 52, 351
83. Klingenberg, M. und Buchholz, M. (1973), Eur. J. Bioch. 38, 346
84. Lauquin, G.J.M. und Vignais, P.V. (1976), Biochemistry 15, 2316
85. Krämer, R. und Klingenberg, M. (1977) FEBS Lett. 82, 363
86. Kimelberg, H.K. und Papahadjopoulos, D. (1974), J. Biol. Chem. 249, 1071
87. Warren, G.B., Birdsall, N.J.M., Lee, A.G. und Metcalfe, J.C. (1974) in "Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation", Hrsg. Azzone, Klingenberg, Qua-

- gliariello und Siliprandi, North Holland Publ. Comp., Amsterdam
88. Warren, G.B., Toon, P., Birdsall, N.J.M., Lee, A.G. und Metcalfe, J.C. (1974), *Biochemistry* 13, 5501
 89. Spencer, T.L., See, J.K. und Bygrave, F.L. (1976), *Biochim. Biophys. Acta* 423, 365
 90. Goldberg, A.L. und Dice, J.F. (1974), *Ann. Rev. Biochem.* 43, 835
 91. Razin, S. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 265, 241
 92. Ernster, L., Siekevitz, P. und Palade, G.E. (1962), *J. Cell. Biol.* 15, 541
 93. Butler, T.F., Smith, G.L. und Grula, E.A. (1967), *Can. J. Microbiol.* 13, 1471
 94. Selinger, Z., Klein, M. und Amsterdam, A. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 183, 19
 95. Racker, E. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 224
 96. Eytan, G.O., Matheson, M.J. und Racker, E. (1976), *J. Biol. Chem.* 251, 6831
 97. Hilden, S., Rhee, H.M. und Hokin, L.E. (1974), *J. Biol. Chem.* 249, 7432
 98. Knowles, A.F. und Racker, E. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 3538
 99. Klingenberg, M., Riccio, P., Aquila, H., Schmiedt, B., Grebe, K. und Topitsch, P. (1974), in "Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation"; Hrsg. Azzone, Klingenberg, Quagliariello und Siliprandi; North Holland Publ. Comp., Amsterdam, S. 229
 100. McCans, J.L., Lindenmayer, G.E., Pitts, B.J.R., Ray, M.V., Raynor, B.D., Butler, V.P. und Schwartz, A. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 7257

LEBENS LAUF

Reinhard Krämer,
8 München 40, Belgradstr. 23

geb. am 5. 5. 1948 in Ludwigsburg

Eltern : Richard Krämer, Ingenieur
Elisabeth Krämer, geb. Daniel

Apr. 1955 - März 1959	Grundschule in Bietigheim
Apr. 1959 - Juni 1967	Aurain-Gymnasium in Bietigheim
Okt. 1967 - März 1969	Wehrdienst
Apr. 1963	Beginn des Biochemiestudiums an der Universität Tübingen
März 1972 - Apr. 1973	Studium an der Ludwig-Maximilians Universität München
Feb. 1973	Eheschließung mit Maria Remmer
Feb. 1974	Mündliche Diplomprüfung an der Universität Tübingen
März 1974 - Sep. 1974	Diplomarbeit am Institut für Toxi- kologie der Universität Tübin- gen (Abt. für Zelltoxikologie, Ltfr. Prof. Dr. W. Kunz)
Nov. 1974 - Sep. 1977	Doktorarbeit am Institut für Phy- sikalische Biochemie der Lud- wig-Maximilians Universität München (Ltfr. Prof. Dr. M. Klingenberg)
seit Apr. 1977	Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assi- stenten

